Lane Medical Library

Aus der
Bayerischen Veterinärpolizeilichen Anstalt Schleißheim.
(Direktor: Prof. Dr. Beck.)

STANFORD UNIVERSITY
NOV
17
1938
LIBRARY

Zur Bakteriologie und Serologie des Tumorkokkus polymorphus haemolytikus.

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität
München.

Vorgelegt von
Heinrich Forster
aus Benediktbeuern.

München 1938

Gedruckt in der Dissertationsdruckerei von Robert Kleinert, Quakenbrück.

Aus der
Bayerischen Veterinärpolizeilichen Anstalt Schleißheim.
(Direktor: Prof. Dr. Beck.)

Zur Bakteriologie und Serologie des Tumorkokkus polymorphus haemolytikus.

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität
München.

Vorgelegt von
Heinrich Forster
aus Benediktbeuern.

München 1938

Gedruckt in der Dissertationsdruckerei von Robert Kleinert, Quakenbrück.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA40153312_0269

Vorgeschichte.

Die Wichtigkeit der Frage der Infektiosität des Krebses für Theorie und Praxis hat zu allen Zeiten der Krebsforschung die bakteriologische Untersuchung von Tumoren aller Art notwendig gemacht. Dabei wurden in pflanzlichen Krebsgeschwülsten vornehmlich stäbchenförmige, in menschlichen und tierischen Tumoren immer wieder Kugelbakterien nachgewiesen. Diese Kokken — allgemein als „Tumorkokken" bezeichnet — sollen im Nachfolgenden einer eingehenden bakteriologischen und serologischen Beschreibung unterzogen werden, einmal, weil sie in bakteriologischen und histologischen Untersuchungen von Geschwülsten regelmäßig angetroffen werden, zum anderen, weil ihre Kennzeichnung bislang durchaus unvollständig ist und das Schrifttum hierüber kaum zu Rate gezogen werden kann. Nicht zuletzt sind die Tumorkokken von Interesse, weil sie von in- und ausländischen Forschern immer wieder in ursächlichen Zusammenhang mit der Entstehung gut- und bösartiger Geschwülste bei Mensch und Tier gebracht werden.

A. Schrifttum.

Besonderes Aufsehen erregten die Mitteilungen amerikanischer Autoren über den Gloverschen Mikroorganismus und den Nuzumschen Streptokokkus als spezifische Tumorkokken.

Glover (8) züchtete 1921 aus Brust-, Blasen-, Uterus-, Lippen-, Prostata- und Lebertumoren einen Mikroorganismus, der vornehmlich unter anaeroben Bedingungen gedeiht, je nach dem verwendeten Nährboden in sehr verschiedenen Formen auftritt und sich grampositiv färbt.

Nach Young und Edinburgh (9) sollen diese Stäbchen sogar eine Entwicklungsphase durchmachen, in welcher sie in Symbiose mit den Zellen leben. Nach Loudon und Mc. Cormack (11) soll der Gloversche Mikroorganismus auch Hyphen bilden. Scott (16) bildete die Entwicklungsphasen „dieser Hyphomycete" sogar ab als kettenbildende Bazillen, in welchen Sporen auftreten, die nach ihrem Freiwerden als „Kokken" imponieren, durch Berkefeldfilter hindurchgehen und sich schließlich noch in blastomyzytenähnliche „Sporensäcke" umwandeln.

Als Beweis für die ursächlichen Beziehungen des Gloverschen Mikroorganismus zum Krebs verweist Scott auf seine Abbildungen von Lippen-, Zungen- und Mammakarzinom, die durch Injektion des Gloverschen Mikroorganismus an Affen entstanden sind. Die mikroskopischen Abbildungen der Affentumoren können nach Teutschlaender (17), Heidelberg, kaum anders wie als Karzinome gedeutet werden.

Nachdem es Scott schließlich noch gelang, den „Glovermikroorganismus" aus den Tiergeschwülsten wieder zu isolieren und rein weiterzuzüchten, halten Scott, Loudon und Mc. Cormack den Gloverschen Mikroorganismus für den „alleinigen" und „Universalkrebserreger", kurz „den Krebserreger".

Als „the ultimate cause of cancer" bezeichnet Ochsner (13) den 1919 von Nuzum (12) entdeckten Streptokokkus. Nuzum selbst gibt an, den Mikrokokkus regelmäßig aus menschlichen Brustkrebsen isoliert zu haben. Wiederholte Injektionen von Reinkulturen bei einem älteren Manne (der bereits früher Epitheliome gehabt hatte), ebenso wie bei Mäusen und einem Hund, erzeugten nach Nuzum bei den Impflingen ein Karzinom, das beim Hund sogar metastasierte.

Auch Rappin und d'Herelle (15) wiesen bereits auf das Vorkommen von Tumorkokken hin. Beiden Forschern gelang es wiederholt, aus menschlichen Krebsgeschwülsten staphylokokkenähnliche Mikroben zu isolieren. Eine morphologische oder biochemische Kennzeichnung der gefundenen Kokken liegt im Schrifttum nicht vor. Desgleichen fehlen Infektionsversuche mit den genannten Tumorkokken, was wohl dahin gedeutet werden kann, daß Rappin u. d'Herelle den beobachteten Tumorkokken eine ätiologische Bedeutung zum Krebs selbst nicht zubilligten.

Die Möglichkeit, daß die Tumorkokken in der Geschwulst das cancerogene Prinzip in sich aufnehmen, haben Fujinami und Inamoto (6) sowie Ernst Fränkel (5) dargetan. Sie fanden, daß die Wirkung des Roussarkoms sich an Staphylokokken anfügte und glauben an die Möglichkeit einer Krebsinfektion über den Weg sonst harmloser, banaler Bakterien. Was in diesem Zusammenhang von besonderem Interesse ist, ist wiederum der Hinweis der genannten Autoren auf das Vorkommen von Kokken in Tumoren, und hier speziell im Roussarkom. Auch die Tumorkokken von Fujinami, Inamoto und Ernst Fränkel sind nicht näher gekennzeichnet und beschrieben worden.

Den Tumorkokken zuzurechnen wäre auch der Mikrokokkus botryogenes, eine Varietät des Staphylokokkus aureus, welcher nach Kitt (10) und anderen Fibrome erzeugen soll.

Gerlach (7) hat in Tumoren aller Art Granula feststellen können, welche einzeln als scharf konturierte, kugelige Körperchen, aber auch in kleinen Verbänden als zarteste Diplokokken, als kurze, etwa 3—4-

gliederige Kettenverbände und in Form kleiner Häufchen auftreten. Auch etwas in die Länge gestreckte, an kleinste Kokkobazillen erinnernde Formen wurden festgestellt. Da diese Gebilde aber weit hinter den Dimensionen der kleinsten bisher bekannten Mikroorganismen zurückbleiben, haben sie mit den Tumorkokken, von denen hier die Rede ist, nichts gemein.

Besonders eingehend hat Profe (14), der aus einer relativ großen Zahl von Tumoren Kokken gezüchtet hat, die Tumorkokken beschrieben. Profes Untersuchungen erstreckten sich auf vier Mammakarzinome, eine Achseldrüse (bei bestehendem Mammakarzinom), drei Uterus- und ein Leberkarzinom, ein Hautkarzinom vom Hund, fünf Sarkome, zwei Karzinome, ein Papillom vom Rind und drei Endotheliome oder Adenokarzinome bei Mäusen. Aus sämtlichen der genannten Tumoren gelang Profe die Isolierung von Tumorkokken, die unter sich zwar kleine Differenzen in ihrem biologischen Verhalten zeigten, z. B. in Schnelligkeit der Gelatineverflüssigung oder Milchgerinnung, die sich aber nach ihrem sonstigen Verhalten als durchaus identisch miteinander erwiesen.

In zahlreichen gefärbten und ungefärbten Ausstrichpräparaten und in vivo, im hängenden Tropfen, gelang, wie Profe ausdrücklich betont, der Nachweis der Kokken im Ausgangsmaterial nicht mit Sicherheit. Auch die Benützung der Gramschen Färbemethode vermochte daran nichts zu ändern.

Die Isolierung der Tumorkokken wurde von Profe in der Weise vorgenommen, daß nach sorgfältigem Sterilisieren der Tumoroberfläche durch Abbrennen mit glühendem Kartoffelmesser, aus der Tiefe und den Randpartien Gewebssaft mit der Platinnadel auf die Nährmedien verimpft wurde, oder auch linsen- bis kleinerbsengroße Stückchen des Tumorgewebes unter besonderer Wahrung steriler Kautelen in das Kulturröhrchen übertragen wurden.

Als Nährmedium diente für die erste Generation Fleischwasser, Peptonbouillon oder Bouillon mit Zusatz von 1—2 % Traubenzucker und ebensoviel Glyzerin. Auch einfache Gelatine, Agar, Zuckeragar und Glyzerinagar wurden benützt.

Auf festen Nährmedien wurde das aufgelegte Tumorstückchen mit einer kleinen Menge Zucker- oder Glyzerinbouillon übergossen. Die mittels Platinöse auf festen Nährmedien gefertigten Gewebssaftausstriche führten stets zu negativem Ergebnis. Die auf gleiche Weise angelegten Kulturen auf flüssigen Nährböden blieben ebenfalls vorwiegend steril; nur in einzelnen wenigen Röhrchen entstand nach 3—5tägiger Bebrütung eine leichte Trübung der Nährflüssigkeit.

Ungleich günstiger gestaltete sich das Ergebnis des Kulturversuches, wenn steril entnommene Gewebsstückchen des Tumors in Nährflüssigkeit übertragen wurden. Hier fand sich nach 2—4 Tagen, selten

auch noch später, bei sämtlichen Neubildungen, aber immer nur in einer gewissen Anzahl der angelegten Kulturen, eine wolkige Trübung der Nährflüssigkeit.

In gefärbten Ausstrichpräparaten von jungen, 2—4 Tage alten Kulturen sah Profe vorwiegend in Reinkultur vorhandene zahlreiche Kokken, die einzeln, öfter auch zu zweien lagen. Diese Diplokokken zeigten abgeplattete Berührungsflächen, so daß sie ein kaffeebohnen- oder gonokokkenähnliches Aussehen hatten. Bisweilen lagen die Diplokokken seitlich aneinander, so daß die ungefärbte Teilungszone mehrerer Erregerpaare eine gerade Linie bildete.

In 3—4 Wochen alten Kulturen waren die Kokken zu unregelmäßigen größeren oder kleineren Haufen gelagert; die Einzelindividuen waren dabei meist von sehr wechselnder Größe. Einzelne Kokken waren nach Profes Mitteilungen vier- bis achtmal größer als in den zwei Tage alten Kulturen.

Nahezu immer fand sich außer den Kokken eine schlecht färbbare amorphe oder feinfaserige Masse.

Die Kokken aus jungen Kulturen färbten sich mit den gewöhnlichen Anilinfarbstoffen leicht. Die Gramfärbung war bei jüngeren Organismen stets positiv.

Im Gelatinestich bei Zimmertemperatur fand langsames Wachstum in Nagelform statt. Die Kuppe ist grauweiß, feuchtglänzend, zackig; der Stich ein gelbgrauer, gleichmäßiger Strich. Nach durchschnittlich 4—6 Tagen begann die Verflüssigung der Gelatine.

Auf Nähragar wuchsen die Kokken in etwa 24 Stunden zu kleinen, länglichen oder kreisrunden, wenig erhabenen, glattrandigen Kolonien aus, die später zu einem grauweißen, feuchtglänzenden Belag konfluierten.

In Milch trat nach 2—6tägiger Bebrütung Gerinnung ein.

Für kleine Versuchstiere zeigten sich die Kulturen sehr wenig virulent. Kaninchen vertrugen Kulturen intraperitoneal bis zu 50 ccm gut. Erst auf 60—100 ccm traten schnell Erkrankung und Tod ein.

Nach Profes Untersuchungen gelang auch die spezifische Agglutination der Tumorkokken mit Serum eines Schafes, welches mit den Kokken vorbehandelt war, bis zu einem Grenztiter von 1 : 125 kräftig. Vergleichsweise beigezogene Testflüssigkeit aus banalen Staphylokokken wurde von dem agglutinierenden Schafserum auch in der Verdünnung 1 : 50 nicht agglutiniert. Kontrollversuche mit Verwendung eines normalen Schafserums und eines mit Staphylokokken vorbehandelten Kaninchenserums hatten in allen Fällen ein durchaus negatives Ergebnis.

Nach den vorliegenden Untersuchungsergebnissen kam Profe zu dem Schluß, daß mit dem regelmäßigen Vorkommen eines spezifischen Kokkus in den Tumoren gerechnet werden muß.

Daß auch Profe die Bedeutung der Tumorkokken vielleicht als Sekundärinfektion, die einen erheblichen Zellreiz darstellt, oder vielleicht als präparatorisches Moment für die Entwicklung der Geschwülste, nicht von der Hand gewiesen wissen will, hat hier nur nebensächliche Bedeutung.

Unabhängig von Profe hat Aman (1) seit nahezu 20 Jahren aus Tumoren aller Art von Mensch und Tier, aus Metastasen und aus Blut Tumorkranker stets das gleiche Kleinlebewesen, einen Kokkus, mikroskopisch und kulturell nachgewiesen.

Nach Amans Feststellungen ist der Tumorkokkus ubiquitär und in der Außenwelt weit verbreitet. Er gehört zu den Staphylokokken und Aman (1) will ihn hier in der Gruppe der sogenannten banalen Kokken untergebracht wissen. Mit den Pyokokken hat der Tumorkokkus nichts gemein, da er nach Injektion weder Fieber noch Abszeßbildung auslöst.

Auch Aman (2) betont das wechselnde Größenverhältnis dieser Kokken und glaubt, daß diese Unterschiede in gewissen Grenzen von den kolloidchemischen Verhältnissen des Nährmediums abhängig sind.

Im Blute, im Gewebsausstrich Krebskranker finden sich die Tumorkokken gewöhnlich als Einzelkokken, bisweilen als Diplokokken, seltener in kleinen, ungeordneten Häufchen und Nestern oder auch in kurzen Ketten. In Gewebsschnitten findet man die gleiche Lagerung der Kokken; hier sieht man aber nach Amans Beobachtungen häufig auch kettenförmige Verbände.

In gefärbten Organausstrichen und in vivo, im hängenden Tropfen gesehenen Präparaten zeigen die Kokken gewöhnlich einen hell aufleuchtenden Hof von Schleim, der sich unter gewissen Umständen verlieren soll. Bei der Kettenbildung legen sich die Kokken mit ihren Schleimhöfen eng aneinander, so daß man nach Aman glauben könnte, eine Schleimhülle umgebe die ganze Kette.

In Gewebszellen konnte Aman die Kokken bislang nicht nachweisen. Sie lagern sich an Erythrozyten an, ohne in dieselben einzudringen. Von den Leukozyten werden sie phagozytiert.

Zur Isolierung der Tumorkokken aus den Geschwülsten empfiehlt Aman, ein Stückchen Krebsgewebe unter Wahrung der Sterilität in Traubenzuckerbouillon von zirka 7,0 pH zu bringen. Da die Kokken meist nur in geringer Zahl im Gewebe des Ausgangsmaterials vorhanden sind, ist es notwendig, daß mehrere Kulturen angelegt und daß die Stückchen möglichst zerkleinert werden, damit das Gewebe mit möglichst großer Oberfläche mit dem Nährboden in Berührung kommt und die Kokken so in das Nährsubstrat leichter gelangen.

Nach 24stündiger Bebrütung bei 37° C bildet sich dann ein krümeliger Bodensatz, der sich bei mikroskopischer Untersuchung in gefärbten Ausstrichen als Reinkultur von Einzelkokken, Diplokokken und

Kokkenhäufchen in regelloser Anordnung erweist. In älteren Bouillonkulturen wird gewöhnlich Kettenbildung beobachtet, wobei 6—8 Einzelindividuen aneinander gereiht sind.

Da der Kokkus Zucker vergärt, kommt es alsbald zur Säuerung des Nährbodens. Die Schleimhöfe der einzelnen Kokken gerinnen dann, es entsteht ein Gewirr von Fäden, das bei zunehmender Säuerung des Nährbodens bald der Auflösung anheimfällt. Bei mikroskopischer Untersuchung in diesem Stadium können dann gewöhnlich schleimhoflose Kokken gesehen werden; diese nehmen die Farbe intensiver an als Kokken mit Schleimhof. Bei immer weiter fortschreitender Säuerung des Nährbodens geht die Kultur allmählich zu Grunde, es bleibt ein kleiner Rest von lebens- und fortpflanzungsfähigen Kokken zurück, die, auf neue Nährboden verimpft, wieder angehen.

Auf festen Nährmedien mit Zucker und Agarzusatz wachsen die Kokken in graugelblichen Rasen.

Nach A m a n verträgt der Kokkus einen leichten Säuregrad des Nährbodens ohne Wachstumsstörungen. Alkalisches Nährsubstrat wird bevorzug. Bei 37° C wächst der Kokkus besonders gut, bei 33° C geht er langsam zu Grunde. Bei Zimmertemperatur geht das Wachstum nur langsam vor sich.

Als Nährboden empfiehlt A m a n Bouillon und Agar mit Zusatz von 1 % Traubenzucker und 1 % Pepton (Witte).

Zur Züchtung der Tumorkokken aus Blut gibt A m a n ca. 2 ccm steril entnommenes Venenblut auf 10 ccm eines auf ca. 40—45° C angewärmten Nährsubstrates.

Der A m a n sche Tumorkokkus verflüssigt langsam Gelatine von der Oberfläche aus und vergärt Glykogen unter Bildung von Milchsäure. Proteolytische Fermente besitzt der Tumorkokkus nur in geringer Menge.

Die Eigenschaften der Tumorkokken wechseln in gewissen Ausmaßen, je nach dem Nährboden, auf dem sie kultiviert werden, und je nach dem Chemismus des Gewebes, dem sie entnommen sind.

Nach A m a n s (3) Beobachtungen ist die Toxizität bei den aus gutartigen und bösartigen Geschwülsten isolierten Tumorkokken verschieden; erstere haben im allgemeinen eine geringere, letztere eine höhere Toxizität. An anderer Stelle weist A m a n auch noch darauf hin, daß die aerob gezüchteten Tumorkokken geringere Virulenz besitzen als die unter anaeroben Bedingungen gewachsenen Erreger.

In Tierversuchen an kleinen Versuchstieren erwiesen sich die Tumorkokken scheinbar wenig pathogen.

Bei Injektionen mit Tumorkokken kommt es, wie bei anderen Infektionen, im Organismus zur Antikörperbildung, die sich durch allergische Reaktionen, z. B. bei subkutaner Einverleibung von spezifischem Tumorkokkenantigen mit typischer Reaktion an der Applikationsstelle, nachweisen läßt.

Der Hinweis, daß es für die Sicherheit der diagnostischen Impfungen belanglos ist, ob das hierzu verwendete spezifische Antigen aus Tumorkokken, die aus menschlichen oder tierischen Tumoren gewonnen wurden, hergestellt wird und daß es insbesondere auch belanglos ist, aus welcher Art von Geschwülsten die zur Antigengewinnung benutzten Tumorkokken stammen, spricht für die Einheitlichkeit der Tumorkokken verschiedener Tumoren.

Die von Aman (1) immer wieder betonten guten Erfahrungen mit der aktiven Immunisierung mit spezifischem Tumorkokkenantigen weisen darauf hin, daß Hand in Hand mit der Antikörperbildung auch eine spezifische Immunstoffbildung vor sich geht, was unser Wissen über die Tumorkokken in besonderem Maße bereichern könnte.

Daß Aman (1) auf Grund seiner langjährigen Beobachtungen und praktischen Untersuchungen an Tumorkokken und Geschwülsten aller Art zu dem Schluß kommt, daß die Tumorkokken in ursächlichem Zusammenhang mit der Entstehung der Geschwülste zu bringen sind, sei hier ohne nähere Stellungnahme, die nicht in den Rahmen dieser Untersuchungen gehört, der Vollständigkeit halber erwähnt.

v. Brehmer (4) züchtete die Tumorkokken aus dem Blute von Krebskranken. In den Bouillonkulturen sah v. Brehmer anfänglich fast ausnahmslos nur sehr feine, „blasse Kokken und Diplokokken". Nach einigen Tagen Bebrütung nahm die Trübung des Nährsubstrates zu. Die mikroskopische Prüfung in gefärbten Kulturausstrichen zeigte zahlreiche Kokken, unter denen sich wiederum viele dicke Stadien („Mastformen") oder auch Vierergruppen in gemeinsamer Hülle erkennen ließen. Nach Ansicht von v. Brehmer ist das blasse Aussehen junger Tumorkokkenkulturen durch die zarte Schleimhülle, die jeden Kokkus umgibt, bedingt.

Zusammenfassend kann gesagt werden:

Ob der Nuzumsche Kokkus mit dem „Gloverschen" Mikrokokkus und mit den später von Profe, Aman und anderen näher beschriebenen Tumorkokken identisch ist, kann nach den vorliegenden Angaben des Schrifttums nicht mehr entschieden werden.

Die unzulänglichen Angaben über den Gloverschen und den Nuzumschen Tumorkokkus durch die amerikanischen Autoren lassen es schließlich auch begreiflich erscheinen, daß diesen Tumorkokken trotz der ihnen mit auf den Weg gegebenen „überragenden Bedeutung" als „Krebserreger" nur wenig Beachtung geschenkt wurde.

Bezüglich der von Rappin und d'Herelle, Fujinami und Inamoto sowie Ernst Fränkel erwähnten Tumorkokken kann wohl vermutet werden, daß es sich bei den von den genannten Autoren erwähnten „kokkenähnlichen Mikroben" oder „Staphylokokken" um die von Profe und Aman beschriebenen Tumorkokken handelt — eine sichere Entscheidung aber lassen diese Mitteilungen nicht zu.

Profe und Aman kamen unabhängig voneinander zu fast durchwegs übereinstimmenden Ergebnissen in ihren Untersuchungen über den Tumorkokkus. Die Mitteilungen beider Forscher ergänzen sich insofern, als Profe die Tumorkokken vornehmlich laboratoriumsmäßig untersucht, während Aman seine Studien an den Tumorkokken über das Laboratorium hinaus in die ärztliche Praxis fortsetzt.

Die Angaben beider Autoren ermöglichen eine wissenschaftliche Verarbeitung und Ergänzung ihrer Untersuchungsergebnisse.

In eigenen Versuchen war zu prüfen, inwieweit Tumorkokken in Geschwülsten aller Art bei Mensch und Tier angetroffen werden. Durch bakteriologische und serologische Untersuchungen sollte ferner geklärt werden, ob Tumorkokken verschiedener Herkunft ein einheitliches Verhalten zeigen, das eine gemeinsame Kennzeichnung rechtfertigt.

B. Eigene Versuche.

Für meine Versuche standen 26 Tumoren verschiedener Art von Mensch und Tier zur Verfügung. Die 17 Tumoren menschlicher Herkunft verdanke ich der liebenswürdigen Uebermittlung durch Herrn Sanitätsrat Dr. Aman, München; die vom Tier stammenden Tumoren konnten leider nur in beschränkter Anzahl (9) erhalten werden. Die Chirurgische Tierklinik der Universität München (Vorstand: Prof. Dr. Westhues) und der Städt. Schlacht- und Viehhof München (Direktor: Prof. Dr. Müller) waren mir bei der Beschaffung des Untersuchungsmaterials vom Tier behilflich*).

Die von mir untersuchten Tumoren können hinsichtlich ihres Aufbaues in folgende Gruppen eingereiht werden.

I. Gruppe:

a) gutartige Tumoren:

1. Papillom Rind 40,
2. Papillom Rind 67,
3. Papillom Rind I,
4. Papillom Rind II,
5. Papillom Mensch I,
6. Papillom Mensch II;

b) bösartige Tumoren:

7. Karzinom Hund I,
8. Karzinom Hund II,
9. Karzinom Uterus Mensch 55,

*) An dieser Stelle sei allen, die mich bei der Beschaffung des Untersuchungsmaterials unterstützten, bestens gedankt.

10. Karzinom Collum Mensch 82,
11. Karzinom Magen Mensch 58,
12. Karzinom Mamma I Mensch,
13. Karzinom Mamma II Mensch,
14. Karzinom Thyreoidea 83,
15. Lebermetastase I eines Mammakarzinoms, Mensch 51,
16. Lebermetastase II eines Mammakarzinoms o. Nr.,
17. Mediast. — Lymphknotenmetastase eines Mammakarzinoms Mensch 81,
18. Metastase eines Schilddrüsenkarzinoms vom Mensch.

II. Gruppe:

a) gutartige Tumoren:

19. Myom Uterus Mensch 55,
20. Myom Uterus Mensch 92,
21. Fibrom Mensch 75;

b) bösartige Tumoren:

22. Sarkom Pferd Hannover,
23. Sarkom Mensch,
24. Sarkom Schädelbasis Mensch 63,
25. Sarkom Maus.

III. Gruppe:

26. Ehrlich — Sarkom Maus.

Aus diesen Tumoren wurde durch Anwendung verschiedener Züchtungsverfahren die Isolierung spezifischer Tumorkokken versucht. Anfänglich bereitete die Züchtung der Tumorkokken erhebliche Schwierigkeiten. Die Verimpfung von Gewebssaft, der aus der Tiefe der Tumoren mit der Platinöse oder dem Glasspatel steril entnommen wurde, führte sowohl bei Verwendung flüssiger als auch fester Nährböden stets zu recht unbefriedigenden Ergebnissen. Die Erfolge waren auch nicht größer, wenn mittels steriler Schere und Pinzette Gewebsstückchen aus der Tiefe der Tumoren entnommen und damit unmittelbar auf festen Nährmedien ausgestrichen wurden.

Lückenlose Ergebnisse lieferte schließlich folgendes Verfahren:

Nach gründlichem Abbrennen der Oberfläche der Tumoren mit dem Kartoffelmesser werden aus der Tiefe zahlreiche hanfkorn- bis erbsengroße Gewebsstücke unter sterilen Bedingungen herausgeschnitten und in Bouillonröhrchen verbracht. Dabei hat es sich als zweckmäßig bewährt, in jedes Bouillonröhrchen mehrere solcher Gewebsstückchen zu verbringen und gleichzeitig aus jedem Tumor ca. 10 Röhrchen anzuzüchten. Nach etwa 6—12stündiger Bebrütung bei 37° C tritt zumeist in der Mehrzahl der beimpften Röhrchen mehr oder weniger

starke Trübung auf. Dieser Zeitpunkt ist geeignet, aus den Bouillonkulturen mit einer Oese Subkulturen auf festen Nährböden anzulegen. Nach ca. 12stündiger Bebrütung der Plattenkulturen bei 37° C gelingt es, unter Einschaltung der Anreicherung in Bouillon, in jedem Fall Reinkulturen der Tumorkokken zu erhalten. Verunreinigungen wurden nur ganz ausnahmsweise einmal beobachtet. Bei länger aufbewahrten Tumoren menschlicher Herkunft fanden sich vereinzelt einmal Proteuskeime, bei Papillomen von Mensch und Tier dann und wann auch einmal Kokken vom Typ des Staphylokokkus flavus vor. Die gleichzeitige Beiziehung von mehreren Anreicherungsmedien und die Ueberimpfung auf ebensoviele feste Nährmedien führte aber in jedem Fall zur Isolierung von Reinkulturen von Tumorkokken.

Diese auf die beschriebene Art ermittelten Kokken sollten nun durch Prüfung ihrer Morphologie, ihres kulturellen und biochemischen Verhaltens, ihrer Resistenz gegenüber verschiedenen Einflüssen und ihrer Pathogenität gegenüber kleinen Versuchstieren sowie durch Anstellung allergischer Reaktionen und durch serologische Untersuchungen eine möglichst genaue Kennzeichnung erfahren.

a) Morphologie.

Vorbemerkung:

Zur Feststellung der **Form-** und **Größenverhältnisse** der Tumorkokken wurden folgende Stämme beigezogen: Papillom Rind 67, Karzinom Magen Mensch 58, Sarkom Schädelbasis Mensch 63, Myom Uterus Mensch 55.

Um eine planmäßige Untersuchung je nach Alter und Zusammensetzung des Nährmediums durchzuführen, wurde von den genannten Ausgangskulturen mit einer sterilen Oese Kulturmaterial entnommen und auf je ein festes und flüssiges Nährsubstrat übertragen. Als fester Nährboden diente Traubenzuckeragar (Zusammensetzung: 1 Teil Rindfleischwasser, 1 Teil Aqua dest., 2 % Pepton Witte, 0,3 % NaCl, 0,2 % Natriumphosphat, 2 % Agar, 1 % Traubenzucker), als flüssiges Nährsubstrat Traubenzuckerbouillon (Zusammensetzung: 1 Teil Rindfleischwasser, 1 Teil Aqua dest., 1 % Pepton flüssig, 0,3 % NaCl, 0,2 % Natriumphosphat, 1 % Traubenzucker). Der pH-Wert war in beiden Fällen 7,4.

Nach 24stündiger Bebrütung der Agar- bzw. Bouillonkulturen bei 37° C wurden Subkulturen auf entsprechende Nährmedien angelegt, welche jeweils in 24stündigem Wechsel bis zur Dauer von 10 Tagen fortgeführt wurden. Gleichzeitig wurden jeweils von den auf festen als auch von den in flüssigen Nährmedien gezüchteten Kulturen je 2 Proben mit der Oese entnommen, auf sorgfältig gereinigte Traggläser leicht ausgestrichen und an der Luft getrocknet. Nach schonendem Fixieren über der Flamme wurde je eine Probe mit Methylenblau, die

andere nach der Gramschen Färbemethode gefärbt und dann eingehend mikroskopisch (Vergrößerung: 1 : 840) untersucht.

Im weiteren wurden zur Ermittlung der Form und Färbbarkeit der Tumorkokken Organausstriche von sämtlichen zur Untersuchung gelangten Tumoren angefertigt.

Zur Feststellung einer geeigneten **Färbemethode** wurden außerdem an 7 Stämmen (Papillom Rind 67, Papillom Rind 40, Sarkom Schädelbasis Mensch 63, Sarkom Mensch, Karzinom Uterus Mensch 55, Karzinom Magen Mensch 58, Myom Uterus Mensch 55) Untersuchungen mit den gebräuchlichsten Farbstoffen und nach den bekanntesten Färbemethoden angestellt. Geprüft wurden junge Kulturen (nach 24stündiger Bebrütung) und alte Kulturen, welche nach dieser Zeit noch 14 Tage bei Zimmertemperatur aufbewahrt wurden.

Die **Kapselfärbung** wurde an Organausstrichen sowie in Bouillon und auf Agar gezüchteten Kulturen versucht. Dabei wurden die Organausstriche aus Myom Uterus Mensch 55 und aus der Metastase eines Schilddrüsenkarzinoms vom Mensch angefertigt. Die Kulturen stammten aus Papillom Rind 40, Sarkom Schädelbasis Mensch 63, Karzinom Uterus Mensch 55 und Myom Uterus Mensch 55.

Die **Beweglichkeitsprüfung** wurde an 24stündigen Bouillonkulturen, die während 10 Tagen fortlaufend aus den Stämmen Papillom Rind 67, Karzinom Magen Mensch 58, Sarkom Schädelbasis Mensch 63 und Myom Uterus Mensch 55 fortgeführt wurden, angestellt. Diese Untersuchungen wurden im hängenden Tropfen bei einer Vergrößerung von 1 : 384 vorgenommen.

Versuchsergebnisse:

Bei den zur Bestimmung der **Form-** und **Größenverhältnisse** angestellten Untersuchungen zeigte sich, daß die auf **festen** Nährmedien gezüchteten Tumorkokken nach Art der Staphylokokken in kleineren und größeren traubigen Häufchen wachsen, deren Einzelindividuen vornehmlich kugelig sind.

In **flüssigen** Nährmedien zeigen sie einen besonderen Formenreichtum. In jungen Bouillonkulturen entstehen immer vorherrschend kugelige Formen, die einen feinen Spalt besitzen, welcher den Kokkus in zwei Hälften teilt. Die Kokken bekommen hierdurch ein kaffeebohnenartiges Aussehen und gleichen in diesem Stadium so vollkommen den Gonokokken, daß eine Verwechslung mit letzteren durchaus möglich ist. Mit Vorliebe reihen sich die Kaffeebohnenformen so aneinander, daß die Spalten der einzelnen eine fortlaufende Gerade bilden. Neben den Gonokokkenformen treten immer auch Diplokokkenformen auf, deren Einzelindividuen einmal mehr kugelig, ein anderes Mal mehr ovoid sein können. Sogar ausgesprochen lanzettförmige oder flammenförmige Kokken reihen sich manchmal zu Diploformen aneinander und erinnern in ihrem Aussehen an den Diplokokkus lanzeolatus. Bei fortschreitendem Alter der Kultur in Bouillon treten bei allen Tumor-

kokkenstämmen zweierlei Formen auf, von denen die eine wohl als Mast- oder Blähform, die andere wohl als Degenerationsform zu verstehen ist. Die Mastformen sind kugelige, auffallend große, an Hefezellen erinnernde Formen, die zwar regelmäßig, aber immer nur vereinzelt oder in geringer Zahl beobachtet werden können. Die als Degenerationsform bezeichneten sind ausgesprochen ovoide Kokken, die sich ungefähr nach Art der „bipolar-gefärbten" Bakterien repräsentieren. Sie sind indessen wesentlich größer als die eigentlichen bipolaren Bakterien und unterscheiden sich von diesen auch durch die weniger scharfe Berandung der plasmolytischen Zone. Schließlich finden sich in älteren Bouillonkulturen auch stets neben zahlreichen, meist mehr ovoiden, einzeln liegenden Kokken, Streptokokkenverbände, wobei meist 6—10 Einzelindividuen kettenartig aneinander gereiht sind (siehe Abbildung 1).

Abbildung 1:
96stündige Bouillonkultur (Papillom Rind 67) (Vergrößerung 1 : 2 000).

Entsprechend der Mannigfaltigkeit der **Form** wechselt auch die **Größe** der Tumorkokken innerhalb ganz erheblicher Grenzen. Die auf

Agar gezüchteten, in der Staphylokokkenform wachsenden Tumorkokken entsprechen in ihrer Größe den Kokken vom Typ des Staphylokokkus aureus hämolytikus. Die Gonokokkenform stimmt in der Größe mit den eigentlichen Gonokokken überein. Bei den Diplo- und Streptokokkenformen variiert die Größe der einzelnen Kokken je nach dem Alter und der Zusammensetzung des Nährsubstrates. Selbst die einzelnen Kokken einer Streptokokkenkette sind bisweilen verschieden groß. Die Bläh- oder Mastformen, die größten Formen der Tumorkokken, kommen ihrer Größe nach kleinen Hefezellen ziemlich nahe, sind aber auch wiederum oft recht verschieden groß. Eine sorgfältige Größenbestimmung, wie man sie in Lehrbüchern bei zahlreichen Bakterien angegeben findet, ist bei den Tumorkokken nur in weiten Grenzen möglich und deshalb nur von geringem praktischen Wert.

In frischen Gewebsausstrichen, die von allen zur Untersuchung gelangten Tumoren angefertigt und nach der Gram'schen Färbemethode gefärbt wurden, waren die Tumorkokken im allgemeinen nur schwer auffindbar. Sie finden sich gewöhnlich als Einzelkokken von kugeliger bis ovoider Form, ganz selten auch einmal in Diplokokkenform vor und färben sich stets grampositiv.

Die zur Feststellung einer geeigneten **Färbemethode** angestellten Untersuchungen ergaben, daß die Färbbarkeit der Tumorkokken im allgemeinen eine gute ist. Sie färben sich mit allen gebräuchlichen Anilinfarben durchwegs zufriedenstellend. Karbolsäurezusätze, wie sie z. B. zur Herstellung des Karbolgentianavioletts oder des Karbolfuchsins gebraucht werden, bedingen immer mehr oder weniger starke Quellungserscheinungen. Safraninlösungen und Methylenblaulösungen liefern bei genügend langer Färbung gute Bilder. Besonders empfehlenswert ist die Färbung nach Gram, da die Tumorkokken in Organausstrichen und in jungen Kulturen stets exakt grampositiv sind. In älteren Kulturen treten allerdings vielfach gramlabile und auch gramnegative Kokken auf. Besonders scharfe Darstellung liefert auch die Giemsafärbung, während die Färbung nach Gerlach, wie sie zur Feststellung von Einschlußkörperchen Anwendung findet, weniger empfehlenswert ist, da keine einheitliche Färbung zustande kommt und die einzelnen Kokken oft einen stark gequollenen Zustand aufweisen. Die Färbung nach Ziehl-Neelson ergab keine Vorteile, da die Gegenfärbung mit Methylenblau stets nur schwach angenommen wurde.

Die nach der Methode von Johne, Klett und Olt an Organausstrichen und Kulturen angestellten **Kapselfärbungen** hatten in jedem Fall ein negatives Ergebnis. Auch die Anwendung des Tuscheverfahrens verlief negativ. Entgegen den Mitteilungen im Schrifttum konnte ein Schleimhof um den Kokkus weder in Organ- noch in Kulturausstrichen ermittelt werden.

Die für die **Beweglichkeitsprüfung** der Tumorkokken angestellten Untersuchungen ergaben eine geringe bis lebhafte Molekularbewegung,

in keinem Falle aber Eigenbewegung. Vergleichende Untersuchungen mit bei Zimmertemperatur bebrüteten Kulturen kamen in Wegfall, da hierbei ein Wachstum nicht erzielt wurde.

b) Kulturelles Verhalten.

Vorbemerkung:

Zur Prüfung des kulturellen Verhaltens der Tumorkokken wurden folgende Stämme beigezogen: Papillom Rind 40, Papillom Rind 67, Sarkom Schädelbasis Mensch 63, Karzinom Uterus Mensch 55, Karzinom Magen Mensch 58, Myom Uterus Mensch 55 und Lebermetastase I eines Mammakarzinoms Mensch 51.

Zur Ermittlung eines geeigneten flüssigen und festen Nährsubstrates wurden Nährmedien der verschiedensten Zusammensetzung beigezogen.

Als **flüssige** Nährmedien wurden zu Beginn der Untersuchungen Rindfleischbouillon, Pferdefleischbouillon und Leberbouillon verwendet.

Zusammensetzung der Nährböden:

Rindfleischbouillon:	1 Teil Rindfleischwasser, 1 Teil Aqua dest., 1 % Pepton flüssig, 0,3 % NaCl, 0,2 % Natriumphosphat.
Pferdefleischbouillon:	1 Teil Pferdefleischwasser, 1 Teil Aqua dest., 1 % Pepton flüssig, 0,3 % NaCl, 0,2 % Natriumphosphat.
Leberbouillon:	1 Teil Pferdeleberwasser, 1 Teil Aqua dest., 1 % Pepton flüssig, 0,3 % NaCl, 0,2 % Natriumphosphat.

Diese Nährböden wurden als solche, sowie mit Zusatz von 1 % Traubenzucker bzw. 1 % Traubenzucker und 1 % Glyzerin verwendet, um auf diese Weise ein für das Wachstum der Tumorkokken möglichst geeignetes Nährsubstrat zu finden.

Zur Ermittlung eines geeigneten pH-Gehaltes wurden die erwähnten Nährmedien weiterhin jeweils mit einem pH-Gehalt von 6,8, 7,4 und 8,0 angefertigt.

Zur Erzielung günstiger Wachstumsbedingungen war es ferner naheliegend, auch andere Zusätze wie Pferdeserum, Aszitesflüssigkeit und Amnionsflüssigkeit, zu Rindfleischbouillon zu prüfen, da gerade diese Eiweißstoffe bekanntlich dem Wachstum von Kokken besonders förderlich sind. Dabei wurde ein Zusatz von jeweils 20 % als ausreichend erachtet. Sämtliche Nährmedien wurden auf der Grundlage von Rindfleischbouillon mit einem ph-Gehalt von 7,8 sowie in jedem Falle mit und ohne Zusatz von Traubenzucker (1 %) hergestellt.

Schließlich sollten auch noch einfache Nährböden, wie Peptonwasser (als solches und mit Zusatz von 1 % Traubenzucker) sowie sterile Milch auf ihre Eignung geprüft werden.

Zur Beimpfung aller oben angeführten Nährmedien wurden 24-stündige Schrägagarkulturen aus den bereits eingangs erwähnten Tumoren beigezogen. Um eine gleichmäßig starke Beimpfung sicher zu stellen, wurde in allen Fällen eine gleich große Oese Kulturmaterial verwendet. Durch gründliches Verreiben desselben an der Berührungsstelle von Flüssigkeitsspiegel und Glaswand sowie durch nachträgliches Schütteln gelang es stets, das Impfmaterial in den flüssigen Nährböden gleichmäßig fein zu verteilen.

Die Bebrütung erfolgte in allen Fällen bei 37° C, wobei eine Bebrütungsdauer von 24 Stunden für ausreichend erachtet wurde. Dabei wurde das Wachstum jeweils sowohl unter aeroben als auch unter anaeroben Verhältnissen geprüft. Die anaerobe Züchtung wurde in der Weise vorgenommen, daß die mit den jeweiligen Kulturen beimpften Röhrchen auf eine Watteunterlage in den Maaßen'schen Apparat gestellt wurden, welcher mittels der Pfeiffer'schen einstufigen Oelpumpe bis auf 15 mm Hg-Druck evakuiert wurde.

Eine Bewertung des Wachstums der Tumorkokken in flüssigen Nährböden konnte nur auf optischem Wege durch vergleichende Beurteilung der Dichtigkeit entstandener Trübungen und der Menge von sich bildendem Bodensatz erfolgen.

Durch diese zahlreichen Züchtungsversuche konnte gleichzeitig die Form und Art des Wachstums der Tumorkokken in flüssigen Nährmedien sicher gestellt werden. Schwierigkeiten bot die Beurteilung des Wachstums in steriler Milch. Hierbei erwies es sich als vorteilhaft, nach 24stündiger Bebrütung der mit gleichen Kulturmengen (1 Oese) beimpften, stets gleichen Milchmengen, eine in allen Fällen gleich große Oese als Subkultur auf eine Traubenzuckeragarplatte auszusäen. Nach 24stündiger Bebrütung dieser Kulturen bei 37° C erfolgte die Beurteilung des Wachstums nach der Zahl von Einzelkolonien auf den Subkulturplatten.

Nach Ermittlung eines geeigneten **flüssigen Nährbodens** sollte auch ein für das Wachstum der Tumorkokken geeigneter **fester Nährboden** gefunden werden.

Wiederum war es notwendig, die gewöhnlichen einfachen Nährböden durch verschiedene wachstumsfördernde Zusätze zu verbessern. Nachdem gewöhnlicher 2%iger Agar (Zusammensetzung: 1 Teil Rindfleischwasser, 1 Teil Aqua dest., 2 % Pepton Witte, 0,3 % NaCl, 0,2 % Natriumphosphat, 2 % Agar) sich auf Grund früherer Erfahrungen als recht wenig geeignet für das Wachstum der Tumorkokken erwies, wurde in erster Linie Traubenzuckeragar (gewöhnlicher 2%iger Agar + 1 % Traubenzucker) ohne und mit Zusatz von Aszitesflüssigkeit (20 %) bezw. Amnionsflüssigkeit (20 %) hergestellt. In weiteren Versuchen wurde geprüft, inwieweit der Traubenzuckerzusatz durch die eiweißhaltigen Stoffe von Aszites- und Amnionsflüssigkeit zu ersetzen war. Schließlich bestand noch die Möglichkeit, durch einen Zusatz von

5 % Pferdeblut bezw. Rinderblut mit oder ohne Zufügung von Amnionsflüssigkeit zu Traubenzuckeragar das Wachstum der Tumorkokken günstig zu beeinflussen.

Für spätere biochemische Untersuchungen konnte auch von Bedeutung sein, das Wachstum der Tumorkokken auf festen Differentialnährböden, wie Fuchsinlaktoseagar noch Endo und Lackmuslaktoseagar nach Drigalski zu prüfen. Im Rahmen dieser Untersuchungen wurden auch Züchtungsversuche in Gelatine (Stichkulturen) vorgenommen.

Zur Beimpfung der aufgeführten festen Nährmedien dienten ebenfalls die bereits oben erwähnten 24stündigen Schrägagarkulturen. Auch hier wurde wiederum versucht, mit gleichen Mengen von Kulturmaterial die zu prüfenden Nährböden zu beimpfen. Zur Erzielung von Einzelkolonien und Vermeidung des Zusammenfließens von Kulturrassen wurden die Nährmedien stets mit trockner Oberfläche verwendet.

Die Züchtung erfolgte in allen Fällen bei einer Temperatur von 37° C und unter aeroben Verhältnissen während einer Zeit von 24 Stunden. Die Bebrütung der Gelatinestichkulturen wurde bei 22° C vorgenommen, das Wachstum während einer Dauer von 10 Tagen beobachtet.

Die Bewertung des Wachstums auf festen Nährböden bot keine Schwierigkeiten. Bis zu 25 Kolonien auf der Fläche eines Nährmediums in Petrischalengröße wurden als geringes Wachstum, eine Kolonienzahl bis zu 50 als mittelmäßiges und darüber hinaus als starkes Wachstum gewertet. Neben der Beurteilung der Stärke des Wachstums boten die zahlreichen Untersuchungen auch reichlich Gelegenheit, die Koloniefform festzuhalten.

Ein eingehendes Studium der Koloniebildung ermöglichte schließlich die Züchtung in Mikrokulturen nach Fortner. Zu diesen Untersuchungen wurden außer den genannten 7 Stämmen noch beigezogen: Papillom Rind I, Papillom Mensch II, Karzinom Hund I, Karzinom Hund II, Karzinom Collum Mensch 82, Karzinom Mamma II Mensch, Karzinom Thyreoidea 83, Lebermetastase II eines Mammakarzinoms o. Nr., Mediast.-Lymphknotenmetastase eines Mammakarzinoms Mensch 81, Metastase eines Schilddrüsenkarzinoms vom Mensch, Myom Uterus Mensch 92, Fibrom Mensch 75 und Sarkom Mensch. Die Mikrokulturen wurden auf Traggläsern angelegt und mit Deckgläsern abgedeckt. Traggläser und Deckgläser wurden vorher gründlich sterilisiert und unmittelbar vor der Benutzung mit Alkohol abgebrannt. Zur Erzielung von Einzelkulturen diente folgendes Verfahren: Auf 2 sterile Deckgläser wurde je 1 Tropfen Traubenzuckerbouillon gebracht. In einem dieser Tropfen wurden Spuren von Kulturmaterial, wie sie an einem gewöhnlichen Platindraht ohne Oese bei Berührung mit der Kultur haften bleiben, verrieben. Aus dieser Verreibung wurde in derselben Weise der zweite Tropfen beimpft, um so eine genügende Verdünnung zu schaffen. Nachdem nach erfolgter gründlicher Vermengung mit dem

Kulturmaterial der zweite Bouillontropfen gleichmäßig und dünn ausgestrichen worden war, wurde, unter Abdecken mit einer sterilen Petrischale, den Ausstrichen Gelegenheit gegeben, bei Zimmertemperatur zu trocknen. Der auf 45—50 ° C abgekühlte Traubenzuckeragar wurde mittels Pipette unter tunlichster Wahrung der Sterilität in einer Menge von 0,2 ccm auf die sterilen Traggläser verteilt und die Deckgläser mit der Kulturschicht nach unten langsam und in schräger Haltung, um jegliche Blasenbildung zu vermeiden, aufgelegt. Nach Entfernung von allenfalls an den Rändern austretenden Agarteilen mit dem Skalpell wurden die so hergestellten Kulturen, in sterile Petrischalen eingeschlossen, im Brutschrank bei 37 ° C bebrütet. Nach etwa 12stündiger und weiterhin nach 24stündiger Bebrütung wurden die Kulturen bei einer Vergrößerung von 1 : 82 im Mikroskop besichtigt.

Versuchsergebnisse:

Bei der Prüfung der zur Untersuchung geeigneter Wachstumsbedingungen der Tumorkokken verwendeten **flüssigen Nährmedien** zeigte sich, daß in gewöhnlicher **Rindfleischbouillon** von den zur Untersuchung beigezogenen 7 Stämmen nur 4 bei einem pH-Gehalt von 6,8 und 8,0 gediehen, bei einem pH-Gehalt von 7,4 nur ein Stamm. Das Wachstum war in allen Fällen gering, es zeigte sich lediglich eine leicht staubige Trübung der Bouillon.

Ein Zusatz von 1 % Traubenzucker bedingte, ohne Rücksichtnahme auf den pH-Gehalt, eine wesentliche Förderung. Sämtliche Stämme zeigten ein mehr oder weniger starkes Wachstum. Dabei bewirkte der Unterschied im pH-Gehalt von 6,8 bzw. 7,4 keine merkliche Wachstumsbeeinflussung, während der pH-Gehalt von 8,0 bei allen Stämmen noch ein sichtlich stärkeres Wachstum ermöglichte. Während in reiner Rindfleischbouillon keine Bodensätze auftraten, erfolgte nunmehr nach Zusatz von 1 % Traubenzucker recht beachtliche Bodensatzbildung. Die etwa 6 cm hohe Bouillonsäule war teilweise bis zu 2 cm Höhe mit flockig krümeligem Bodensatz erfüllt und die darüber stehende Flüssigkeit zumeist trüb, seltener klar.

Ein Zusatz von 1 % Glyzerin zu Traubenzuckerbouillon bedingte keine beachtenswerte Wachstumszunahme. Lediglich ein Stamm (Papillom Rind 40) zeigte hier ein besonders günstig beeinflußtes Wachstum. Alle übrigen Stämme wuchsen unter starker Trübung und Bodensatzbildung. Durch den verschiedenen pH-Gehalt traten Unterschiede im Wachstum der Tumorkokken bei dieser Zusammensetzung des Nährmediums nicht zutage.

Zusammenfassend kann gesagt werden: Ein Zusatz von Traubenzucker zu Rindfleischbouillon begünstigt das Wachstum der Tumorkokken in besonderem Maße, wobei sich ein pH-Gehalt zwischen 7,4 und 8,0 am geeignetsten erweist. Ein weiterer Zusatz von Glyzerin vermag keine merkliche Wachstumssteigerung hervorzubringen. Das Wachstum in Rindfleischbouillon ist, ohne Rücksichtnahme auf allen-

fallsige Zusätze und den pH-Gehalt, entweder trüb und staubig oder es entsteht mehr oder weniger starker, flockig krümeliger Bodensatz, wobei die darüber stehende Nährflüssigkeit leicht trüb oder auch einmal ganz klar erscheint.

In gewöhnlicher **Pferdefleischbouillon** trat bei der Mehrzahl der Stämme ein nur geringes bis mittelmäßiges Wachstum auf. Eine Beeinflussung durch verschiedenen pH-Gehalt konnte hier nicht festgestellt werden. In allen Fällen zeigte sich lediglich eine staubige Trübung des Nährmediums.

Ein Zusatz von Traubenzucker zur Bouillon änderte die Wachstumsbedingungen nicht sehr bedeutend, wenn auch eine merkliche Förderung ersichtlich war. Nur ein Stamm (Karzinom Uterus Mensch 55) fiel durch sein üppiges Wachstum auf. Die Unterschiede im pH-Gehalt traten hier deutlicher hervor. Mit zunehmender Alkalität des Nährmediums stieg das Wachstum an; es war bei einem pH-Gehalt von 8,0 am stärksten. Wie früher, so bewirkte auch hier ein Zusatz von Traubenzucker Bodensatzbildung.

Eine weitere Ergänzung des Nährmediums mit 1 % Glyzerin brachte auch hier keine nennenswerte Verbesserung. Nur bei einem pH-Gehalt von 8,0 trat stärkeres Wachstum mit Bodensatzbildung auf.

Pferdefleischbouillon ermöglicht also mit und ohne Zusatz von Traubenzucker bzw. Traubenzucker und Glyzerin das Wachstum der Tumorkokken, wobei sowohl Traubenzucker für sich, als mit Zugabe von Glyzerin wiederum in annähernd gleichem Maße der Vermehrung förderlich sind. Der pH-Gehalt zwischen 7,4 und 8,0, und damit eine geringe Alkalität des Nährmediums, sagt den Tumorkokken besser zu als ein geringerer pH-Wert (6,8). Das Wachstum bewirkt stets staubige Trübung und leichte, flockige Bodensatzbildung, letztere jedoch nur nach Zufügung der genannten Zusätze.

Die besondere Eignung der **Leberbouillon** für bakterielle Züchtungszwecke war Veranlassung, diesen Nährboden mit und ohne Zusätze zu verwenden. Mit Ausnahme eines Stammes (Lebermetastase I eines Mammakarzinoms Mensch 51) zeigten alle Kulturen in Leberbouillon ohne Zusatz ein nur mittelmäßiges Wachstum. Auch Unterschiede bei verschiedenem pH-Gehalt traten kaum hervor.

Eine Bereicherung des Nährbodens durch Traubenzucker mit oder ohne Glyzerin bewirkte nur eine geringe Steigerung des Wachstums, die besonders bei den pH-Werten von 7,4 und 8,0 zur Geltung kam. Während der Traubenzuckerzusatz nur vereinzelt (bei 2 Stämmen Papillom Rind 67 und Sarkom Schädelbasis Mensch 63) Bodensatzbildung veranlaßte, trat dies bei Zusatz von Glyzerin zur Traubenzuckerbouillon in vermehrtem Maße auf.

Die **Leberbouillon** ohne und mit Zusätzen von Traubenzucker und Glyzerin hat demnach besondere Versprechungen nicht erfüllt. Das Wachstum bewegte sich stets nur in mäßigen Grenzen. Eine Alkalität

des Nährbodens zwischen 7,4 und 8,0 beeinflußte auch hier das Wachstum günstig. Auch in Leberbouillon bestand das Wachstum in staubiger Trübung und flockiger Bodensatzbildung.

Die Züchtung in Rindfleischbouillon, Pferdefleischbouillon und Leberbouillon führte durch Vergleich zu folgenden Feststellungen: Ohne Verwendung irgendwelcher Zusätze liefert die besten Wachstumsbedingungen die Leberbouillon. Bei Zusatz von Traubenzucker, welcher dem Wachstum außerordentlich förderlich ist, erweist sich die Rindfleischbouillon allen anderen Nährbodengrundlagen überlegen. Dabei bringt ein weiterer Zusatz von Glyzerin keine merklichen Vorteile und ist daher entbehrlich. Bedeutungsvoller ist der pH-Gehalt: Während ein pH-Gehalt von 6,8 das Wachstum zweifellos hemmt, eignet sich ein pH-Gehalt zwischen 7,4 und 8,0 in besonderem Maße, weshalb ein pH-Gehalt von 7,8 späteren Züchtungsversuchen zu Grunde gelegt werden soll. Das Wachstum war, ohne Rücksicht auf Art und Zusammensetzung des Nährbodens, staubig trüb und führte mit zunehmender Stärke zu Bodensatzbildung, wobei die Bodensätze aus flockig krümeligen Massen bestanden und in besonders günstigen Nährmedien (Rindfleischtraubenzuckerbouillon) bis zu 2 cm hoch waren. In einzelnen Kulturen (Papillom Rind 67, Sarkom Schädelbasis Mensch 63, Myom Uterus Mensch 55) bestand nur Bodensatzbildung, während die darüberstehende Flüssigkeit klar war. Indessen konnten diese Erscheinungen nicht so regelmäßig beobachtet werden, daß ihnen eine kennzeichnende Bedeutung zuerkannt werden könnte.

Die zur Erzielung günstiger Wachstumsbedingungen weiterhin verwendeten Zusätze erfolgten auf der Grundlage von Rindfleischbouillon mit einem pH-Gehalt von 7,8, da sich diese nach den bisherigen Erfahrungen als besonders geeignet erwies.

Bei einem Zusatz von 20 % Pferdeserum zu der erwähnten Nährbodengrundlage zeigten sämtliche 7 Stämme ein verhältnismäßig geringes Wachstum, welches in Trübung und leichter, flockiger Bodensatzbildung bestand. In Uebereinstimmung mit den bisher gemachten Beobachtungen bedeutete auch hier ein Zusatz von Traubenzucker (1 %) eine wesentliche Verbesserung des Wachstums. Die Mehrzahl der Stämme wuchs unter starker Trübung und beachtlicher Bodensatzbildung.

Die von humanmedizinischer Seite immer wieder empfohlene Verwendung von **Aszitesflüssigkeit,** die in den vorliegenden Versuchen in einer Menge von 20 % der Rindfleischbouillon (7,8 pH) zugesetzt wurde, zeitigte recht wenig befriedigende Ergebnisse. Zwei Stämme (Karzinom Uterus Mensch 55 und Lebermetastase I eines Mammakarzinoms Mensch 51) gediehen überhaupt nicht, alle übrigen wuchsen nur unter feiner Flöckchenbildung oder leichter Trübung. Der Zusatz von Traubenzucker hob die Wachstumsfreudigkeit einzelner Stämme (Papillom Rind 67, Sarkom Schädelbasis Mensch 63, Karzinom Magen

Mensch 58, Myom Uterus Mensch 55) bedeutend. Neben starker Trübung trat bei diesen ergiebige Bodensatzbildung, bei allen übrigen lediglich hauchartige Trübung des Nährmediums ein.

Amnionsflüssigkeit in 20 % Zusatz ermöglichte wohl sämtlichen Stämmen die Vermehrung, sie blieb jedoch in allen Fällen gering und bestand nur in leichter Trübung der Bouillon. Der Zusatz von Traubenzucker erwies sich auch hier wachstumsfördernd. Neben starker Trübung trat mit Ausnahme eines Stammes (Lebermetastase I eines Mammakarzinoms Mensch 51) ein kräftiges Wachstum unter Trübung und Bodensatzbildung auf.

Vergleichend kann aus den unter Zusatz von Pferdeserum (20 %), Aszitesflüssigkeit (20 %) und Amnionsflüssigkeit (20 %) angestellten Kulturversuchen entnommen werden: bei Verwendung von Pferdeserum und Amnionsflüssigkeit gelingt es zweifellos bessere Wachstumsbedingungen zu schaffen, während die Beiziehung von Aszitesflüssigkeit die Eignung der gewöhnlichen Rindfleischbouillon kaum zu heben vermag. Wenn auch der Zusatz von Pferdeserum bzw. Amnionsflüssigkeit günstigere Wachstumsbedingungen als gewöhnliche Rindfleischbouillon zu bieten vermögen, so doch nicht in dem Maße, daß ihre Zugabe sich im Hinblick auf die durch derartige Zusätze oft in Frage gestellte Sterilität lohnen würde. Mehr als den Zusätzen von Pferdeserum, Aszites- und Amnionsflüssigkeit allein kommt der weiteren Beigabe von Traubenzucker in Uebereinstimmung mit früheren Feststellungen Bedeutung zu. Ein Vergleich des Wachstums der Tumorkokken in Rindfleischbouillon mit alleinigem Zusatz von Traubenzucker besagt jedoch, daß die Beigabe von Pferdeserum, Aszites- oder Amnionsflüssigkeit entbehrlich ist, weil durch sie das an und für sich gute Wachstum in Rindfleischtraubenzuckerbouillon kaum übertroffen wird.

Die großen Vorteile eines möglichst einfachen Nährbodens, wie sie **Peptonwasser** (3 %) und sterile Milch sind, sollen hier nicht auseinandergesetzt werden. Das Wachstum in Peptonwasser schien auch im Hinblick auf spätere biochemische Untersuchungen in dieser Nährbodengrundlage von Bedeutung.

Leider eignet sich Peptonwasser ohne irgendwelche Zusätze zur Züchtung der Tumorkokken recht wenig. 4 von den 7 zum Versuch beigezogenen Stämme zeigten nur ganz geringe Wachstumsfreudigkeit, während die übrigen 3 Stämme kaum mehr als eine leichte Trübung des Nährmediums veranlaßten. Der Zusatz von Traubenzucker vermochte zwar das Wachstum zu steigern, konnte jedoch nicht mehr als leichte Trübung und Bodensatzbildung erreichen.

Bessere Ergebnisse zeitigten Züchtungsversuche in steriler **Milch,** in welcher es bei allen Stämmen gelang, ein kräftiges Wachstum zu erzielen.

Peptonwasser mit einem pH-Gehalt von 7,8 eignet sich als Nährbodengrundlage, wie sie speziell für biochemische Untersuchungen ge-

dacht ist, recht wenig; das Wachstum ist zu gering. Die Züchtung in Milch ist zwar im allgemeinen wenig beliebt, vermag aber brauchbare Ergebnisse zu liefern.

Die bisher angestellten Züchtungsversuche in flüssigen Nährböden wurden unter **aeroben** und **anaeroben** Bedingungen durchgeführt. Abgesehen von unwesentlichen Abweichungen, wie sie das Wachstum verschiedener Stämme gleicher Keimart stets aufweist, konnten Unterschiede in der Wachstumsstärke zwischen aerob und anaerob gezüchteten Kulturen nicht festgestellt werden. Die anaerobe Züchtung brachte auch keinerlei Aenderungen in der Wuchsform mit sich, weshalb es sich erübrigt, ihre Ergebnisse im einzelnen aufzuführen.

Die zur Untersuchung beigezogenen Tumorkokkenstämme gedeihen sowohl unter aeroben als auch anaeroben Verhältnissen gleich gut. Der Einfachheit wegen ist aber das aerobe Züchtungsverfahren dem anaeroben vorzuziehen, wenn ihm auch sonst kein anderer Vorzug zuerkannt werden kann.

Ein eingehendes Studium der Tumorkokken setzt voraus, daß stets gleichmäßig und kräftig gewachsene Stämme, die in lückenloser Folge fortgeführt werden konnten, jederzeit zur Verfügung stehen. Dabei verspricht die Züchtung auf **festen Nährböden** eine sichere und einwandfreie Beschaffung von Reinkulturen, wie sie als Ausgangsmaterial für alle vorliegenden Versuche unentbehrlich sind. Der zur Gewinnung von Reinkulturen aus Organmaterial bereits verwendete Traubenzuckeragar erwies sich für diese Zwecke in früheren und vorliegenden Versuchen stets als besonders geeignet. Diese Feststellung deckt sich im übrigen auch mit den in flüssigen Nährmedien erzielten Ergebnissen, die dafür sprechen, daß Rindfleischtraubenzuckerbouillon allen übrigen flüssigen Nährmedien in Bezug auf ihre Eignung für das Wachstum der Tumorkokken überlegen ist.

Da sich die Brauchbarkeit des Traubenzuckeragars mit einem pH-Gehalt von 7,8, der auf Grund der bisherigen Ergebnisse beibehalten werden sollte, in den zahlreichen Versuchen zur Gewinnung und Fortführung von Reinkulturen aus Organmaterial immer wieder bestätigt hatte, erübrigt es sich, eigene Versuche zur Prüfung der Eignung dieses Nährbodens anzustellen. Sämtliche Tumorkokkenstämme wuchsen auf diesem Nährboden innerhalb 24 Stunden mehr oder weniger üppig, in kreisrunden oder ovalen, auf feuchteren Nährmedien zusammenfließenden, trüben, grauweißen, scharf berandeten Kolonien, die sich nicht wesentlich über die Oberfläche des Nährbodens erhoben. Lediglich 2 Stämme (Karzinom Hund I und Mediastinallymphknotenmetastase eines Mammakarzinoms Mensch 81) fielen wiederholt durch ein mehr gelbliches Wachstum auf.

Die, in dem Bestreben, diesen an und für sich für das Wachstum der Tumorkokken sehr geeigneten Nährboden zu verbessern, gemachten Zusätze von **Aszites- bzw. Amnionsflüssigkeit** (20 %) bewirkten in

gleicher Weise bei allen Stämmen ein üppiges Wachstum. Die Versuche, den Traubenzucker durch die eiweißhaltigen Stoffe von Aszites- und Amnionsflüssigkeit zu ersetzen, erzielten sehr wenig befriedigende Ergebnisse. Dabei war das Wachstum in dem mit Aszitesflüssigkeit (20 %) hergestellten Agar noch besser als in dem gleichen mit Amnionsflüssigkeit (20 %) versetzten Nährmedium. Die Kolonien zeigten auch bei diesen Untersuchungen das bereits oben angegebene Aussehen und eine glasig glänzende Oberfläche.

Ein Zusatz von 5% **Pferdeblut** bzw. 5 % **Rinderblut** zu Traubenzuckeragar hatte bei allen Stämmen ein sehr starkes Wachstum zur Folge. Die Züchtungsergebnisse waren auf diesen Nährmedien so einheitlich, daß weder dem Pferdeblut noch dem Rinderblut irgend ein Vorzug zuerkannt werden kann. Je nach der Ueppigkeit des Wachstums besaßen die Kolonien mehr graugrüne, milchig graue, silbergraue oder mehr lehmgelbe Farbtönung; im übrigen unterschieden sich die Koloniebilder in nichts von den bereits früher gemachten Angaben.

Neben einem guten Wachstum vermochte der Zusatz von Blut auch die haemolysierende Eigenschaft aller Tumorkokkenstämme deutlich aufzuzeigen (vgl. Abbildung 2). Sämtliche verwendeten Stämme zeigten nach 24stündigem Wachstum beginnende oder bereits stark ausgeprägte Hämolyse, eine Erscheinung, welche für die Kennzeichnung der Tumorkokken beachtlich ist.

Abbildung 2:
48stündige Blutagarkulturen (aus Myom Uterus Mensch 55).

Durch den zu obigen Blutnährböden gemachten Zusatz von 20 % Amnionsflüssigkeit erfuhr das an und für sich schon gute Wachstum keine wesentliche Beeinflussung. Form und Farbe der Kolonien traten hier in gleicher Weise in Erscheinung.

Es kann somit festgestellt werden, daß ein Zusatz von Blut dem an und für sich guten Wachstum auf Traubenzuckeragar nur insoweit förderlich ist, als hierdurch gleichzeitig die Erkennung der Tumorkokken durch den Nachweis der Hämolyse erleichtert wird. Diesem Vorteil steht der nicht unerhebliche Nachteil gegenüber, daß ein Zusatz von Blut, auch wenn er unter den üblichen sterilen Verhältnissen erfolgt, eine Verunreinigung des Nährmediums mit Kokken und anderen Keimen nicht stets mit Sicherheit auszuschließen vermag. Eine weitere Bereicherung durch Zusatz von Amnionsflüssigkeit kann, da hierdurch die Möglichkeit einer Verunreinigung erhöht wird und eine wesentliche Verbesserung nicht gesehen wurde, nicht empfohlen werden.

Die für allgemeine diagnostische Zwecke verwendeten Nährböden, wie Fuchsinlaktoseagar noch Endo und Lackmuslaktoseagar nach Drigalski, versprachen von vornehereein wegen ihres Zusatzes von Anilinfarbstoffen (Fuchsin bzw. Kristallviolett) wenig Erfolg. Auch mit einer differentialdiagnostischen Verwertung konnte kaum gerechnet werden, nachdem die Mehrzahl der Kokken gegenüber Milchzucker nur geringe Aktivität zeigt. In der Tat konnte sowohl auf Endo- als auch auf Drigalskiagar nur ein mäßiges Wachstum beobachtet werden, wobei sämtliche Stämme nach 24stündiger Bebrütung als farblose, glasige Kolonien von geringer Größe gediehen. Nach 48stündiger Bebrütung trat allgemein nur leichte Rötung als Hinweis für eine verzögerte und geringe Einwirkung auf Milchzucker auf.

Die den meisten banalen Kokken gemeinsame Eigenschaft, auch bei anderen Temperaturen zu gedeihen, berechtigte dazu, Züchtungsversuche in Gelatine bei 22 ° C anzustellen. Sämtliche Tumorkokkenstämme gediehen im Gelatinestich kräftig unter Entwicklung eines weißlichgrauen, mattglänzenden, nagelförmigen Kulturbildes nur äußerst langsam. Späteren biochemischen Untersuchungen soll vorausgeschickt werden, daß die Tumorkokken Gelatine nicht verflüssigen.

Das von Fortner empfohlene Verfahren zur Herstellung von Mikrokulturen stellte eine äußerst anregende Züchtungsmethode vor, die weitgehenden Einblick in die Entstehung der Kolonieform ermöglicht. Die dabei erzielten Ergebnisse bedeuten eine wesentliche Bereicherung des bakteriologischen Studiums eines Erregers, weshalb dieses Verfahren, wo immer es die Wachstumsbedingungen eines Keimes ermöglichen, nicht versäumt werden sollte.

Von den 21 nach diesem Verfahren geprüften Stämmen zeigten 19 ein gutes Wachstum. Lediglich 2 Stämme (Papillom Rind 40 und Karzinom Hund II) gediehen nicht. Nach 6stündiger Bebrütung zeigten

sich auf der Mehrzahl der angelegten Mikrokulturen feinste, mit freiem Auge kaum sichtbare, stippchenförmige Kolonien, welche bei mikroskopischer Betrachtung (Vergr. 1:82) als drehrunde, scharf begrenzte Kolonien sichtbar waren. Nach 12stündigem Aufenthalt der Kulturen bei 37 ° C wiesen sämtliche Stämme, mit Ausnahme der oben genannten, ein kräftiges Wachstum auf. Die Kolonien hatten zu dieser Zeit entweder eine kreisrunde Form oder ein mehr fleckenförmiges, unregelmäßig begrenztes Aussehen. Nach 24stündiger Bebrütung war die kreisrunde Form entweder beibehalten worden, wobei bisweilen einzelne Kolonien miteinander in Achter- oder Kleeblattform zusammenflossen, oder es waren unregelmäßig begrenzte, fleckige Formen entstanden, während die schon nach 12 Stunden fleckenförmig gewachsenen Kulturen bei einer Beobachtung nach 24 Stunden gleiches Aussehen zeigten. Die Ränder waren bei jungen als auch bei alten Kolonien mehr oder weniger scharf begrenzt. Der Farbton der Kolonien war durch die gelbgraue Nährbodenunterlage beeinträchtigt.

Die Fortnerkultur ermöglicht nach sorgfältigem Abheben des Deckglases in einfacher Weise das Abimpfen von Einzelkolonien. Verunreinigungen mit Luftkeimen, wie sie bei unvorsichtigem Anfertigen der Mikrokulturen einmal auf den Nährboden gelangen können, sind im Mikroskop meist leicht von den übrigen durchaus einheitlichen Wuchsformen der spezifischen Erreger zu unterscheiden.

Eine Verwendung von Blutagar zur Herstellung der Mikrokulturen in der Absicht, hierdurch gleichzeitig die hämolysierende Wirkung der Tumorkokken zu prüfen, führte in wiederholten Versuchen zu keinerlei brauchbaren Ergebnissen, da der Blutnährboden sich bei einer Bebrütung bei 37 ° C in dünnen Schichten stets mißfarbig gelb bis rotbraun verfärbte.

c) Biochemisches Verhalten.

Vorbemerkung:

Bei der Häufigkeit des Vorkommens von Kokken verschiedener Art, die entweder als mehr oder weniger spezifische Erreger (pyogene Kokken) oder als Verunreinigungskeime bei der Züchtung von Tumorkokken aus Organmaterial auftreten, ist es notwendig, zur eindeutigen Kenntlichmachung der Tumorkokken das biochemische Verhalten dieser Erreger näher zu beschreiben. Zu diesem Zwecke wurden verschiedene Tumorkokkenstämme (Papillom Rind 40, Papillom Rind 67, Karzinom Uterus Mensch 55, Karzinom Collum Mensch 82, Karzinom Magen Mensch 58, Lebermetastase I eines Mammakarzinoms Mensch 51, Karzinom Thyreoidea 83, Myom Uterus Mensch 55 und Sarkom Schädelbasis Mensch 63) in ihrem Verhalten gegenüber Kohlehydraten, wie sie gewöhnlich zu biochemischen Untersuchungen verwendet werden, geprüft.

Neben einer Untersuchung in Milchzucker, Traubenzucker, Saccharose, Dulzit, Mannit nach Hetsch, Arabinose, Rhamnose und D-Tartrat nach Christensen, wurde auch ihr Verhalten in Lackmusmilch, Neutralrotagar nach Rothberger und Schaeffler sowie in Glyzerinfuchsinbouillon nach Stern geprüft. Wegen des Vorkommens Indol bildender Kokken wurde auch die Anstellung der Indolreaktion beigezogen. Traubenzucker und Milchzucker wurden in Form der Barsiekowlösungen I u. II unter Einbringung eines Gärhütchens in die Kulturröhrchen verwendet. Saccharose, Mannit und Dulzit wurden jeweils mit Zusatz von Lackmusmolke geprüft. Die Arabinose- und Rhamnoseprüfung erfolgte in Arabinosemolke nach Bahr bzw. Rhamnosemolke nach Bitter, Weigmann und Habs unter Zufügung von je 2 Tropfen Methylrotlösung als Indikator. Die Lackmusmilch war nach der von Chyrissowergis für die Typentrennung der Streptokokken empfohlenen Zusammensetzung hergestellt Zur Anstellung der Indolreaktion wurde die Methode nach Neißer und Pringsheim unter Verwendung von Trypsinbouillon mit Zusatz von Pringsheim'scher Lösung verwendet. Die Ablesung erfolgte jeweils nach 24, 48, 72, 96 und 144 Stunden. Dabei war es notwendig, die Arabinose- und Rhamnoseuntersuchungen viermal anzusetzen, um nach 24-, 48-, 72- und 96stündiger Bebrütung durch Zusatz der Methylrotlösung die Reaktion prüfen zu können. Die Indolreaktion wurde dreimal angesetzt und nach 24, 48 und 96 Stunden durch Zusatz von Pringsheim'scher Lösung geprüft. Alle übrigen Nährmedien wurden bis zu einer Dauer von 144 Stunden beobachtet.

Versuchsergebnisse:

Die Ergebnisse der biochemischen Untersuchungen sind in Tabelle 1 (biochemische Untersuchungen an Tumorkokken) zu ersehen. Danach steht fest, daß sämtliche der biochemischen Prüfung unterstellten Tumorkokkenstämme ohne Rücksicht auf ihre Herkunft ein einheitliches biochemisches Verhalten zeigten. Ihre Inaktivität gegenüber Arabinose, Rhamnose, Dulzit, Neutralrot, Glyzerinfuchsinbouillon und D-Tartrat, ihre geringe Einwirkungsfähigkeit auf Barsiekow-Milchzucker, der erst nach 48stündiger Bebrütung leichte Rötung zeigte, ihre verzögerte Saccharosespaltung (erst von 48 Stunden ab) sprechen für eine geringe biochemische Aktivität. Das Verhalten gegenüber Traubenzucker, wobei die Barsiekowlösung wohl schon nach 24 Stunden Rötung zeigte, in keinem Falle aber auch zu einem späteren Zeitpunkt weder Gasbildung noch Fällung, spricht ebenfalls dafür. Auch die Beeinflussung des Mannits, welcher nach 48 Stunden Rötung, nach 144 Stunden beginnende Fällung aufwies, berechtigt keinen anderen Schluß. Desgleichen waren auch die Reaktionen in Lackmusmilch verzögert, in welcher der Umschlag in weiß bis rosa erst nach 48 Stunden und eine Gerinnung erst von 72 Stunden ab erfolgte. Die Indolreaktion war in allen Fällen bis zu 96 Stunden negativ.

Tabelle 1.

Biochemische Untersuchungen an Tumorkokken.

Nährsubstrat	Reaktion nach ... Stunden:	Papillomstämme	Karzinomstämme	Sarkomstamm	Myomstamm
Milchzucker	48 144	leichte Rötung keine Fällung, kein Gas	leichte Rötung keine Fällung, kein Gas	leichte Rötung keine Fällung, kein Gas	leichte Rötung keine Fällung, kein Gas
Traubenzucker	24 144	Rötung keine Fällung, kein Gas	Rötung keine Fällung, kein Gas	Rötung keine Fällung, kein Gas	Rötung keine Fällung, kein Gas
Saccharose	48	Rötung	Rötung	Rötung	Rötung
Mannit	48 144	Rötung Fällung	Rötung Fällung	Rötung Fällung	Rötung Fällung
Arabinose	24, 48, 72 u. 96	negativ	negativ	negativ	negativ
Rhamnose	24, 48, 72 u. 96	negativ	negativ	negativ	negativ
Dulzit	144	negativ	negativ	negativ	negativ
Lackmusmilch	24 48 72	unverändert bis Umschlag in weiß weiß bis rosa zunehmende Rötung und Gerinnung			
Neutralrot	144	negativ	negativ	negativ	negativ
Glyzerin-fuchsin-bouillon	144	negativ	negativ	negativ	negativ
D-Tartrat	144	negativ	negativ	negativ	negativ
Indol	24 48 96	negativ	negativ	negativ	negativ

Die Tumorkokkenstämme verschiedener Herkunft zeigen ein einheitliches biochemisches Verhalten, das lediglich in Form geringer, oder verzögerter Säurebildung in Milchzucker, Traubenzucker, Saccharose, Mannit und in Lackmusmilch zum Ausdruck kommt.

Bei der Prüfung des Wachstums der Tumorkokken auf **festen Blutnährböden** war aufgefallen, daß sämtliche Stämme mehr oder weniger starke Hämolyse zeigten (vergleiche Abbildung 2). Diese Beobachtung gab Veranlassung, in eingehenden Versuchen die hämolysierende Eigenschaft der Tumorkokken näher zu prüfen. Zum Nachweis der Hämolyse wurde die Methode nach Bernard gewählt, weil dieses Verfahren in anderen Versuchen sich als besonders zuverlässig erwiesen hat.

Vorbemerkung:

Zu den Versuchen wurden folgende Tumorkokkenstämme beigezogen: Papillom Rind 67, Karzinom Hund I, Karzinom Hund II, Karzinom Uterus Mensch 55, Karzinom Collum Mensch 82, Karzinom Magen Mensch 58, Karzinom Thyreoidea 83, Lebermetastase I eines Mammakarzinoms Mensch 51, Mediast-Lymphknotenmetastase eines Mammakarzinoms Mensch 81, Myom Uterus Mensch 55, Myom Uterus Mensch 92 und Sarkom Schädelbasis Mensch 63.

Nach den Angaben von Bernard wurden 24stündige aerob bei 37° C in Rindfleischtraubenzuckerbouillon (pH 7,8) bebrütete Kulturen verwendet.

Weiterhin wurden keimfreie Filtrate aerob und anaerob in dem gleichen Nährmedium während 4 Wochen gezüchteter Kulturen geprüft. Zur Herstellung dieser Kulturen dienten die Stämme: Papillom Rind 40, Papillom Rind 67, Karzinom Uterus Mensch 55, Karzinom Magen Mensch 58, Myom Uterus Mensch 55, Sarkom Schädelbasis Mensch 63 und Sarkom Pferd Hannover.

Schließlich sollte noch festgestellt werden, inwieweit die in den keimfreien Filtraten ermittelten hämolysierenden Stoffe nach einer Erhitzung auf 63° C noch wirksam waren. Zu diesen Versuchen wurden lediglich 3 Stämme (Papillom Rind 67, Karzinom Magen Mensch 58 und Myom Uterus Mensch 55) beigezogen; die Kulturen wurden während 28 Tagen in Traubenzuckerbouillon (pH 7,8) aerob bei 37° C bebrütet, hernach keimfrei filtriert und das Filtrat während einer halben Stunde auf 63° C erhitzt.

Die keimfreien Filtrate wurden unter Verwendung eines Seitzfilters hergestellt.

Die Bouillonkulturen und keimfreien Filtrate wurden in Mengen von 0,1 bzw. 0,2 ccm mit 2 ccm physiologischer Kochsalzlösung (0,85 %) versetzt, mit 0,2 ccm einer 3%igen Hammelblutkörperchenaufschwemmung in physiologischer Kochsalzlösung in Reagenzgläschen gründlich gemischt und bei Zimmertemperatur aufgestellt. Zum Ausschluß un-

spezifischer hämolysierender Wirkungen wurde in allen Versuchen sterile Bouillon an Stelle der Kultur oder des keimfreien Filtrates in die Versuchsanordnung eingereiht. Zur weiteren Ueberprüfung des Verfahrens wurde auch eine Bouillonkultur sicher hämolysierender Kokken (Staphylokokkus aureus vom Mensch) sowie ein bestimmt hämolysenegativer Kokkenstamm (Luftkokken) mit einbegriffen.

Die Ablesung erfolgte jeweils nach 30, 60, 90 und 120 Minuten. Nachdem sich innerhalb dieser Zeit die Blutkörperchen mehr oder weniger stark zu Boden senken, gelingt es leicht, an der überstehenden Flüssigkeit eine auch schon geringe Rotfärbung infolge stattgehabter Hämolyse festzustellen. Nur unvollständige Hämolyse, bei welcher neben zahlreichen roten Blutkörperchen nur geringe himbeerrote Verfärbung der überstehenden Flüssigkeit gesehen wurde, wurde als geringe, deutliche Rotfärbung der Flüssigkeit als mittelstarke und totale Hämolyse, bei welcher alle roten Blutkörperchen zerfallen waren und der Farbton der Flüssigkeit ein deutlich roter war, als starke Reaktion bezeichnet.

Versuchsergebnisse:

Bei Verwendung von 0,1 ccm 24stündiger, unter aeroben Verhältnissen gediehener **Bouillonkulturen,** zeigten alle Tumorkokkenstämme mit Ausnahme eines Stammes (Myom Uterus Mensch 92) mehr oder weniger starke Hämolyse, die bereits nach 60 Minuten sichtbar in Erscheinung trat. Die zu dieser Zeit noch geringe Reaktion verstärkte sich nach 90 Minuten langer Beobachtung bei den meisten Tumorkokkenstämmen erheblich und hatte bei 7 Stämmen nach 120 Minuten zu einer totalen Hämolyse geführt. Trotz der allgemeinen Einheitlichkeit in diesen Versuchsergebnissen weist der Stamm Karzinom Collum Mensch 82 überragend kräftige, der Stamm Karzinom Thyreoidea 83 selbst bis zur Dauer von 120 Minuten nur geringe Hämolyse auf. Diese unterschiedlichen Werte dürften aber nicht allein als Ausdruck verschieden stark hämolysierender Wirkung aufzufassen sein, sondern müssen letzten Endes auch mit dem mehr oder weniger gleichmäßig dichten Wachstum der Ausgangskulturen in Einklang gebracht werden. So erklärt sich auch der negative Ausfall der Hämolysereaktion beim Stamm Myom Uterus Mensch 92, der im Ausgangsnährmedium nur äußerst geringes Wachstum aufwies.

Von den beigezogenen Vergleichskokken lieferte der hämolysierende Staphylokokkus aureus von der 60. Minute ab ein positives, der nicht hämolysierende Vergleichsstamm selbst nach 120 Minuten noch ein negatives Ergebnis. Die vergleichsweise Prüfung von Traubenzuckerbouillon ohne irgend welche bakterielle Zusätze verlief ebenfalls negativ.

Bei Verwendung einer doppelten Menge von Bouillonkulturen (0,2 ccm) wurden so übereinstimmende Versuchsergebnisse erzielt, daß sich

eine eingehende Besprechung derselben erübrigt. Erwähnt sei nur, daß sich bei Verwendung der doppelten Kulturmenge das geringe Wachstum des Stammes Myom Uterus Mensch 92 weniger auswirkte; von der 60. Minute ab trat eine geringe Hämolyse ein.

Die Prüfung hämolysierender Eigenschaften in der nach Bernard angegebenen Methode erwies, daß zahlreiche Tumorkokkenstämme verschiedener Herkunft in 24stündigen Bouillonkuren mehr oder weniger ausgeprägte Hämolyse bedingen.

Die Prüfung **keimfreier Filtrate aerob** während 4 Wochen bebrüteter Bouillonkulturen führte bei Verwendung von 0,1 ccm des Filtrates zur Anstellung der Bernard'schen Reaktion zu recht unbedeutenden Ergebnissen. In einer Zeit bis zu 90 Minuten konnte in keinem Falle irgend welche hämolysierende Wirkung beobachtet werden. Nach 120 Minuten war bei 6 der geprüften Stämme eine geringe, bei einem (Karzinom Uterus Mensch 55) keinerlei Hämolyse feststellbar.

Die Verwendung der doppelten Menge des Ausgangsmaterials (0,2 ccm des keimfreien Filtrates) besserte die Versuchsergebnisse wesentlich auf. Bereits nach einer Zeit von 60 Minuten zeigten alle hierbei verwendeten Stämme Hämolyse, die sich bei 3 Stämmen (Karzinom Magen Mensch 58, Myom Uterus Mensch 55, Papillom Rind 67) in der 90. und 120. Minute erheblich verstärkte und bei allen übrigen Stämmen mehr oder weniger unverändert in gleicher Stärke fortbestand.

Die Prüfung keimfreier Filtrate aus **anaerob** gezüchteten Kulturen führte bei Verwendung der kleinen Menge von 0,1 ccm des Filtrates in gleicher Weise wie oben zu recht unbefriedigenden Ergebnissen. Fünf durchaus negativen Ergebnissen stehen nur zwei gering positive mit den Stämmen Papillom Rind 67 und Karzinom Uterus Mensch 55 gegenüber. Auch diese beiden positiven Fälle zeigten erst nach 120 Minuten Hämolyse.

Bei Verwendung der größeren Menge (0,2 ccm) des keimfreien Filtrates verbesserten sich auch bei den aus anaerob gezüchteten Kulturen hergestellten Filtraten die Ergebnisse erheblich. Sämtliche Stämme zeigten bereits nach 60 Minuten geringe Hämolyse, die in der Mehrzahl der Fälle bis zu 120 Minuten unverändert fortbestand und nur bei 2 Stämmen (Papillom Rind 67 und Karzinom Uterus Mensch 55) eine geringe Steigerung erfuhr.

Die zur Kontrolle bei diesen Untersuchungen wiederum beigezogene keimfreie Traubenzuckerbouillon lieferte in allen Fällen ein stets negatives Ergebnis.

Die Versuche, inwieweit die auf 63° C erhitzten Kulturfiltrate noch befähigt waren, Hämolyse auszulösen, wurden nur in geringerem Umfang durchgeführt; sie ergaben aber eindeutig, daß die Bernard'sche Reaktion bei Verwendung von 0,2 ccm des erhitzten Kulturfiltrates bereits nach 60 Minuten geringe, nach 90 bzw. 120 Minuten bedeutend

verstärkte Hämolyse zeigte. Der Konltrollversuch war wiederum negativ.

Zusammenfassend kann gesagt werden: Keimfreie Kulturfiltrate aus aerob und anaerob gezüchteten Bouillonkulturen verschiedener Tumorkokkenstämme vermögen mehr oder weniger starke Hämolyse hervorzurufen. Bei Verwendung von 0,2 ccm des Ausgangsmaterials zur Anstellung des Bernard'schen Versuches werden durchaus bessere Ergebnisse erzielt als bei Verwendung der geringeren Menge von 0,1 ccm. Diese Feststellung soll dahin gewertet werden, daß durch eine größere Menge des Ausgangsmaterials Unterschiede, wie sie einmal durch die verschiedene Dichtigkeit des Wachstums in den Ausgangskulturen und zum anderen durch verschieden starke Befähigung, Hämolyse hervorzurufen, verwischt werden. Beachtlich ist, daß auch auf 63 ° C erhitzte keimfreie Kulturfiltrate aus 4 Wochen alten Bouillonkulturen positive Ergebnisse zeitigten.

d) Resistenz.

Die große Widerstandsfähigkeit zahlreicher Kokkenarten gegenüber Wärme, Kälte und Austrocknung ist bekannt. Dies gab Veranlassung, die Resistenz der Tumorkokken in flüssigen Nährmedien gegenüber Erwärmung und starker Abkühlung (Gefrieren) zu prüfen und weiterhin die Widerstandsfähigkeit von an Filtrierpapierstreifen angetrockneten Tumorkokken gegenüber Austrocknung bei verschiedenen Temperaturen zu untersuchen.

Die Resistenz gegenüber Erhitzen wurde an folgenden Tumorkokkenstämmen geprüft: Papillom Rind 40, Papillom Rind 67, Karzinom Uterus Mensch 55, Karzinom Collum Mensch 82, Karzinom Magen Mensch 58, Karzinom Thyreoidea 83, Lebermetastase I eines Mammakarzinoms Mensch 51, Myom Uterus Mensch 55 und Sarkom Schädelbasis Mensch 63.

Als Ausgangsmaterial dienten 48stündige bei 37 ° C aerob gezüchtete Traubenzuckerbouillonkulturen. Von jedem der zur Untersuchung beigezogenen Stämme wurden 6 Röhrchen mit Bouillonkulturen im Wasserbad auf 50—98 ° C erhitzt. Erstmals bei 50 ° C, weiterhin bei 60, 70, 80, 90 und 98 ° C wurde immer je 1 Kulturröhrchen dem Wasserbad entnommen und nach kräftigem Durchschütteln je eine Oese des Kulturmaterials auf eine Traubenzuckeragarplatte (pH 7,8) übertragen. Nach 36stündiger Bebrütung dieser Subkulturen bei 37 ° C erfolgte die Ablesung des Wachstums, wobei zwischen einem starken, mittelgradigen und geringgradigen, je nach Zahl der aufgegangenen Kolonien, unterschieden wurde.

In weiteren Versuchen, welche lediglich auf einen Papillom-, Karzinom-, Sarkom- und Myomstamm ausgedehnt wurden, erfolgte die Prüfung der Widerstandsfähigkeit der Tumorkokken in Bouillonkulturen gegenüber Gefrieren.

Kräftig gewachsene Bouillonkulturen wurden in einer Kältemischung eingefroren. Nach 30 Minuten waren sie vollkommen durchgefroren. Nach einer Gefrierdauer von 15 Minuten wurden die Bouillonkulturen bei Zimmertemperatur wieder aufgetaut, wozu eine Zeitspanne von 25 Minuten erforderlich war. Zur Feststellung, ob die gefrorenen Kulturen noch lebens- und vermehrungsfähig waren, wurden wiederum Subkulturen, diesmal unter Verwendung von Blutagarplatten (pH 7,8) angelegt. Die Ablesung erfolgte nach 36stündiger Bebrütung bei 37 ° C unter den oben angegebenen Gesichtspunkten.

Die Prüfung der Haltbarkeit von Tumorkokken, welche an Filtrierpapierstreifen angetrocknet waren, wurde an den schon zum ersten Versuch beigezogenen 9 Stämmen vorgenommen.

Von jedem dieser Stämme wurde ein Kölbchen mit ca. 50 ccm Traubenzuckerbouillon (pH 7,8) beimpft und während 24 Stunden bei 37 ° C bebrütet. Das Wachstum war bei allen Kulturen ein kräftiges. In der Folge wurden jeweils 3 ca. 10 cm lange und 1 cm breite, sterilisierte Filtrierpapierstreifen unter tunlichster Wahrung steriler Verhältnisse vollkommen in die aufgeschüttelten Bouillonkulturen eingetaucht und einzeln in sterile Reagenzgläser mit Wattestopfenverschluß verbracht. Je ein so hergestellter Papierstreifen aller beigezogenen Stämme wurde im Kühlschrank bei 4 ° C oder im Brutschrank bei 37 ° C aufbewahrt oder bei Zimmertemperatur dem Tageslicht ausgesetzt. Jeweils nach Ablauf einer Woche wurden von den unter verschiedenen Verhältnissen aufbewahrten Filtrierpapierstreifen ca. 1 cm lange Stücke mit steriler Schere abgeschnitten, in Röhrchen mit Traubenzuckerbouillon verbracht und die so beimpften Röhrchen bei 37 ° C 24 Stunden bebrütet, um dann auf ein allenfallsiges Wachstum untersucht zu werden. Die Versuche wurden bis zu einer Dauer von 9 Wochen ausgedehnt.

Versuchsergebnisse:

Eine Erwärmung auf 50 bis 60 ° C wurde von allen Tumorkokkenstämmen ohne irgendwelche Schädigung vertragen. Von den auf 70 ° C erhitzten Bouillonkulturen zeigten nur 2 Stämme unbehinderte Wachstumsfreudigkeit (Papillom Rind 40, Karzinom Uterus Mensch 55), bei 6 weiteren Stämmen war das Wachstum in geringem Maße vermindert worden, während es bei einem Stamm (Karzinom Thyreoidea 83) ausblieb. Trotz einer Erhitzung auf 80 ° C zeigten alle Tumorkokkenstämme wiederum mehr oder weniger starke Wachstumsfreudigkeit; auch der bei Erhitzung auf 70 ° C ausgefallene Stamm (Karzinom Thyreoidea 83) wies wieder mittelgradiges Wachstum auf. Auffällig vermindert war das Wachstum der meisten Tumorkokkenstämme erst nach einer Erhitzung auf 90 ° C; lediglich ein Stamm (Papillom Rind 40) gedieh hier noch mittelmäßig, während 5 weitere Stämme nur mehr recht mäßig wuchsen und bei 3 Stämmen (Karzinom Magen Mensch 58, Lebermetastase I eines Mammakarzinoms Mensch 51 und Karzinom

Thyreoidea 83) das Wachstum ganz ausblieb. Besonders beachtlich ist, daß auch eine Erhitzung der Kulturen auf 98° C von 5 unter 9 Stämmen überstanden wurde. Dabei erwies sich der bei 90° C durch fehlendes Wachstum ausgefallene Stamm Karzinom Magen Mensch 58 noch als vermehrungsfähig, während die beiden anderen Stämme (Lebermetastase I eines Mammakarzinoms Mensch 51 und Karzinom Thyreoidea 83), weil sie sowohl nach Erhitzung auf 90° C als auch auf 98° C kein Wachstum mehr aufwiesen, anscheinend abgetötet waren.

Die Hitzeresistenz der Tumorkokken in flüssigen Nährmedien ist somit recht beachtlich. Temperaturen von 50 und 60° C wurden von zahlreichen Tumorkokkenstämmen verschiedener Herkunft ohne jegliche Beeinflussung vertragen. Höhere Temperaturen engten wohl ihre Wachstumsfreudigkeit erheblich ein, vermochten sie jedoch nicht in allen Fällen vollkommen zu unterdrücken. Wie andere saprophytisch vorkommende Kokken vermag selbst eine kurzfristige Erhitzung auf Siedetemperatur (98°) sie nicht mit Sicherheit abzutöten. Als besonders hitzeresistent erwiesen sich 2 Papillomstämme, 1 Karzinom-, Myom- und Sarkomstamm, was dahin ausgelegt werden soll, daß Unterschiede in der Hitzebeständigkeit bei Tumorkokken verschiedener Herkunft kaum bestehen.

Eindeutige Versuchsergebnisse lieferten die Untersuchungen an gefrorenen Tumorkokkenkulturen. Sämtliche hier untersuchten Stämme haben eine Gefrierdauer von 15 Minuten, welche schließlich noch durch eine Zeitspanne von 30 Minuten bis zum Eintritt der Vereisung und eine weitere von 25 Minuten bis zur völligen Auftauung erheblich verlängert wurde, überstanden. Diese Feststellung spricht für eine **erhebliche Kälteresistenz der Tumorkokken.**

Bei der Widerstandsfähigkeit gegenüber Kälte und Wärme ist es nicht verwunderlich, daß die an Filtrierpapierstreifen angetrockneten Tumorkokken aller zum Vergleich beigezogenen Stämme, abgesehen von unwesentlichen Schwankungen in der Dichtigkeit des Wachstums, bei Aufbewahrung im Kühlschrank (4° C) bis zur Dauer von 9 Wochen lebens- und vermehrungsfähig blieben. In der 9. Woche zeigte sich allerdings bei einzelnen Stämmen eine geringgradige Verminderung des Wachstums, die sich aber, nachdem eine Fortführung des Versuches nicht mehr möglich war, einer weiteren Beurteilung entzieht.

Wider Erwarten erlitten die an Filtrierpapierstreifen angetrockneten Tumorkokken, welche bei Brutschranktemperatur (37° C) aufbewahrt wurden, bereits nach 2 Wochen erhebliche Schädigungen. 2 Stämme (Karzinom Magen Mensch 58 und Sarkom Schädelbasis Mensch 63) zeigten nach dieser Zeit bereits kein Wachstum mehr und konnten bei siebenmaliger Nachprüfung bis zur 9. Woche als abgestorben befunden werden. Nach 3 Wochen erhöhte sich die Zahl der abgestorbenen Stämme bereits auf 7 und nur 2 Stämme (Papillom Rind 40 und Papillom Rind 67) besaßen noch geringere bzw. stärkere Wachstums-

fähigkeit. Obwohl der eine der beiden Papillomstämme noch nach 7 Wochen geringgradiges Wachstum zeigte, sprechen negativ ausgefallene Züchtungsversuche in der 4. und 6. Woche für eine erhebliche Schädigung auch dieses Stammes. Nach 8 Wochen langer Aufbewahrung der Tumorkokken bei Brutschranktemperatur waren sämtliche 9 Stämme abgetötet, wie eine spätere nach 9 Wochen vorgenommene Nachprüfung bestätigte.

Die Aufbewahrung von an Filtrierpapierstreifen angetrockneten Tumorkokken bei Brutschranktemperatur bedingte bereits nach 14 Tagen eine erhebliche Schädigung aller Karzinom-, Sarkom- und Myomstämme, welche von der 3. Woche ab sich bereits als abgetötet erwiesen. Auch die etwas widerstandsfähigeren Papillomstämme erlagen schon nach 5 bzw. 7 Wochen. Für diese Schädigung kann, wie vorhergehende Versuche eindeutig dartun, nicht die Temperatur (37° C) verantwortlich gemacht werden; ohne weiteren Nachweis scheint die Annahme berechtigt, daß die dabei stattgehabte Austrocknung die Ursache hierfür ist.

Die bei Zimmertemperatur dem Tageslicht ausgesetzten, an Filtrierpapierstreifen angetrockneten Tumorkokken wiesen eine noch kürzere Lebensdauer auf. Schon bei einer Prüfung nach 8 Tagen erwies sich ein Stamm (Lebermetastase I eines Mammakarzinoms Mensch 51) als abgetötet. Nach Ablauf der 2. Woche folgten 6 weitere Stämme, nach 3 Wochen langer Aufbewahrung waren bereits 8 Stämme abgetötet und von der 4. Woche ab konnten alle zum Versuch beigezogenen Stämme als abgestorben befunden werden.

Dieser Versuch zeigt eindeutig, daß neben dem schädigenden Einfluß der Austrocknung insbesondere die Einwirkung des Tageslichtes die Lebensfähigkeit der Tumorkokken vermindert.

Die Tumorkokken verschiedener Herkunft sind gegen Hitze und Kälte in recht beachtlicher Weise resistent. Mehr als Hitze und Kälte schädigt sie Eintrocknung und unmittelbare Einwirkung des Tageslichtes. Während bei Erhitzung auf Siedetemperatur eine Abtötung der Tumorkokken nur teilweise gelingt und eine Gefrierdauer von mindestens 15 Minuten sie kaum zu schädigen vermag, töten Austrocknung und Tageslichteinwirkung die Mehrzahl der Stämme (Karzinom-, Sarkom- und Myomstämme) schon nach 3 Wochen. Auch die etwas resistenteren Papillomstämme erliegen diesen Einwirkungen schon nach 3—7 Wochen. Kühlschranktemperatur (4° C), welche die Austrocknung hintanhält, ermöglicht die Aufbewahrung von an Filtrierpapier angetrockneten Tumorkokken während mindestens 9 Wochen.

e) Pathogenität.

Die zur näheren Kennzeichnung der Tumorkokken notwendige Pathogenitätsprüfung erfolgte nicht etwa in der Absicht, mit den aus Tumoren aller Art gezüchteten Kokken Krebs zu erzeugen, sondern sollte

lediglich dazu dienen, die Pathogenität verschiedener Kokkenstämme gegenüber kleinen Versuchstieren zu untersuchen. In erster Linie sollte zu diesem Zweck eine allenfallsige pathogene Eigenschaft 24stündiger Bouillonkulturen aus Tumorkokken verschiedener Herkunft (aus Papillom, Sarkom, Karzinom und Myom) an Kaninchen und Meerschweinchen geprüft werden und weiterhin an gleichen Versuchstieren auch keimfreie Filtrate älterer Bouillonkulturen. Da Aman auf Grund eigener Versuche den anaerob gewachsenen Kulturen und den daraus hergestellten keimfreien Filtraten im Hinblick auf ihre Pathogenität größere Bedeutung beimaß, wurden sämtliche Tumorkokken nach aerober und anaerober Züchtung verwendet.

Für die Pathogenitätsprüfung **24stündiger Bouillonkulturen** wurden folgende Stämme verwendet: Papillom Rind 67, Sarkom Schädelbasis Mensch 63, Karzinom Magen Mensch 58 und Myom Uterus Mensch 55.

Die alsbald nach der Isolierung aus den entsprechenden Geschwülsten verwendeten Kokkenstämme waren bis zur Anstellung des Versuches in 48stündigem Wechsel auf Pferdeblutagar fortgezüchtet worden. Zur Impfung wurde dann eine 24stündige Kultur in Traubenzuckerbouillon verwendet. Als Dosis wurde beim Kaninchen bei subkutaner und intravenöser Applikation eine Menge von 10 ccm pro kg Körpergewicht, bei intrakutaner Verabreichung 0,2 ccm Bouillonkultur einverleibt. Meerschweinchen erhielten bei subkutaner Applikation ebenfalls eine Menge von 10 ccm pro kg Körpergewicht, bei intrakutaner Einverleibung wiederum nur die kleine Menge von 0,2 ccm, weil größere Mengen ohne Platzen der sich bildenden Impfpapel oder Aussickern des Impfstoffes nicht verwendet werden konnten. In jedem Fall wurde die intrakutane Applikation an der Seitenbrust des Impftieres nach Entfernung der Haare auf einer Fläche von ca. 4 × 4 cm vorgenommen.

Entsprechend einer Prüfung von 4 Tumorkokkenstämmen, welche in aerob und anaerob gezüchteten Bouillonkulturen beim Kaninchen subkutan, intravenös und intrakutan und beim Meerschweinchen subkutan und intrakutan zur Anwendung kamen, wurden für die Versuche insgesamt 24 Kaninchen und 16 Meerschweinchen benötigt.

Als Kontrolle wurde je ein Kaninchen subkutan, intravenös und intrakutan mit steriler Traubenzuckerbouillon und je ein weiteres mit aerob gezüchteter Kultur eines für Mäuse sicher pathogenen Stammes von Staphylokokkus aureus (des Menschen) in entsprechenden Dosen geimpft. Gleiche Kontrollversuche wurden bei den an Meerschweinchen vorgenommenen Untersuchungen eingeschaltet. Dadurch erhöhte sich die Zahl der verwendeten Impftiere um 6 Kaninchen und 4 Meerschweinchen.

Zum Nachweis einer allenfallsigen Giftigkeit von **keimfreien Kulturfiltraten** älterer Bouillonkulturen wurden aus 7 Tumorkokkenstämmen (Papillom Rind 40, Papillom Rind 67, Sarkom Schädelbasis Mensch 63, Sarkom Pferd Hannover, Karzinom Uterus Mensch 55, Karzinom Ma-

gen Mensch 58 und Myom Uterus Mensch 55) vierwöchige aerob und anaerob gezüchtete Bouillonkulturen verwendet. Nach kräftigem Wachstum, wobei in allen Fällen recht beachtliche Bodensatzbildung in den einzelnen Bouillonkulturen auftrat, wurden die Kulturen einzeln nach kräftigem Durchschütteln vorfiltriert (Hartpapierfilter) und anschließend unter Verwendung des Seitz'schen Filters und der Wasserstrahlpumpe keimfrei filtriert. Mit Kulturfiltrat eines jeden Stammes wurde je ein Kaninchen subkutan, intraperitoneal und intravenös mit einer Dosis von 5 ccm pro kg Körpergewicht, sowie je ein Meerschweinchen subkutan bzw. intraperitoneal mit der entsprechenden Dosis geimpft. Um allenfallsige Schädigungen, wie sie durch Einverleibung großer Mengen des Nährmediums allein möglich sein könnten, auszuschließen, wurde je ein Meerschweinchen subkutan und intraperitoneal mit entsprechenden Dosen steriler Traubenzuckerbouillon geimpft.

Zur Anstellung dieser Versuchsreihe wurden daher, einschließlich der zur Kontrolle verwendeten Impftiere, insgesamt 45 Kaninchen und 30 Meerschweinchen benötigt.

Die Pathogenitätsprüfung mit lebenden Erregern und daraus hergestellten keimfreien Kulturfiltraten wurde demnach unter Verwendung von 4 bzw. 7 verschiedenen Tumorkokkenstämmen bei intrakutaner, subkutaner, intravenöser und intraperitonealer Einverleibung, einschließlich der Kontrolltiere, an 75 Kaninchen und 50 Meerschweinchen vorgenommen, um durch diese, auf breiter Grundlage angestellten Untersuchungen Schwankungen, wie sie in der Pathogenität verschiedener Stämme und bei verschiedener Verabreichung denkbar sind, zu erfassen.

Sämtliche Versuchstiere wurden einer täglichen mehrmaligen Untersuchung bis zu einer Dauer von 8 Wochen unterzogen. Dabei wurde in erster Linie auf das Auftreten von Lokalerscheinungen an der Impfstelle und weiterhin auf den allgemeinen Gesundheitszustand geachtet. Verendete Tiere wurden einer pathologisch-anatomischen und bakteriologischen Untersuchung mit besonderer Berücksichtigung spezifischer Organ- bzw. Keimbefunde unterzogen. Dabei wurde zur bakteriologischen Untersuchung der Organe die mikroskopische Prüfung und der Züchtungsversuch unter Benützung von Blutagarplatten und Anstellung einer Anreicherung in Traubenzuckerbouillon durchgeführt.

Versuchsergebnisse:

Die **subkutane** Verabrichung aerob und anaerob gezüchteter **24-stündiger Bouillonkulturen** führte weder beim Kaninchen noch beim Meerschweinchen und mit keinem der zum Versuch beigezogenen Tumorkokkenstämme (Papillom Rind 67, Sarkom Schädelbasis Mensch 63, Karzinom Magen Mensch 58 und Myom Uterus Mensch 55) zu spezifischer Erkrankung oder Verenden des Tieres.

Ein Meerschweinchen, das mit aerob gezüchteter Bouillonkultur des Papillomstammes subkutan geimpft war, verendete allerdings 3 Wochen

nach der Impfung, wobei sich eine eitrige Einschmelzung der etwa walnußgroßen Kehlgangslymphknoten zeigte. Daneben bestand leichte Milzschwellung und Brüchigkeit der Leber. Da es weder aus den eitrig eingeschmolzenen Lymphknoten, noch aus den übrigen Organen gelang, die spezifischen Tumorkokken zu isolieren und alle anderen mit gleichem Kokkenstamm geimpften Versuchstiere keinerlei ähnliche Krankheitserscheinungen, insbesondere keinerlei Veränderungen an der Impfstelle oder im Bereich der regionären Lymphknoten zeigten, wird diese Einzelbeobachtung als unspezifische Erkrankung ohne jeglichen Zusammenhang mit der Impfung angesprochen. Diese Annahme ist umsomehr berechtigt, als derartige Erkrankungen bei Meerschweinchen an und für sich nicht gerade selten sind.

Während die zur Kontrolle mit steriler Traubenzuckerbouillon geimpften Versuchstiere ohne Störung des Allgemeinbefindens die Beobachtungszeit überdauerten, verendete das mit aerob gezüchteter Bouillonkultur des Staphylokokkus aureus subkutan geimpfte Kaninchen bzw. Meerschweinchen bereits nach jeweils 4 Tagen. Der Zerlegungsbefund ergab beim Kaninchen eitrige Einschmelzung des Unterhautzellgewebes in weitem Umkreis von der Impfstelle sowie eitrige Metastasen in der Leber, beim Meerschweinchen ebenfalls sulzig eitrige Beschaffenheit des Unterhautzellgewebes an der Impfstelle, sowie leichte Milzschwellung und Leberdegeneration. In beiden Fällen gelang aus den Organen der Nachweis des Staphylokokkus aureus.

Die **intravenöse Verabreichung** aerob und anaerob gezüchteter 24-stündiger Bouillonkulturen der gleichen Kokkenstämme veranlaßte 3 recht beachtliche Todesfälle.

Ein mit aerober Kultur des Stammes Myom Uterus Mensch 55 in einer Menge von 0,2 ccm geimpftes Kaninchen (von 820 g Körpergewicht) zeigte 14 Tage nach der Impfung vollkommene Lähmung der Nachhand, verbunden mit Muskelschwund, und verendete 26 Tage nach Versuchsbeginn. Der Sektionsbefund bestand in übermäßiger Füllung der Blase (Blasenlähmung), starker Kotstauung (Darmlähmung) und Vergrößerung beider Nieren, welche auffallend anämisch waren. Bedauerlicherweise blieben umfangreiche kulturelle Untersuchungen ohne Ergebnis.

Von den mit anaerob gezüchteten Bouillonkuren geimpften Kaninchen verendeten 2 und zwar ein mit 16,8 ccm des Stammes Sarkom Schädelbasis Mensch 63 vorbehandeltes Kaninchen (im Gewicht von 1680 g), sowie ein mit 15,8 ccm Bouillonkultur des Stammes Myom Uterus Mensch 55 (im Gewicht von 1580 g) geimpftes Kaninchen. Besonders auffällig war der Krankheits- und Zerlegungsbefund des mit Stamm Sarkom Schädelbasis Mensch 63 vorbehandelten Kaninchens. Auch dieses zeigte wiederum zu Lebzeiten Lähmungserscheinungen der Nachhand mit Muskelschwund und verendete bereits 10 Tage nach Versuchsbeginn. Die Zerlegung ergab auch hier deutlich die Erschei-

nungen der Blasenlähmung. Weiterhin konnte in der Bauchhöhle eine größere Menge gelblicher, klarer Flüssigkeit, auffallende Blaßfärbung der Nieren, sowie starke Blutfülle in Leber und Milz beobachtet werden. Bakteriologische Organuntersuchungen führten, wie oben, zu keinem positiven Ergebnis.

Das mit anaerob gezüchteter Bouillonkultur des Stammes Myom Uterus Mensch 55 geimpfte Kaninchen verendete bereits 5 Tage nach der intravenösen Verabreichung. Während am lebenden Tier sinnfällige Krankheitserscheinungen nicht feststellbar waren, ergab die Zerlegung Tracheitis und Pneumonie sowie Leberdegeneration. Durch den Züchtungsversuch gelang es, aus der Niere die spezifischen Erreger zu isolieren.

Alle übrigen zu diesem Versuch verwendeten Impftiere überdauerten ohne irgendwelche Krankheitserscheinungen die Beobachtungszeit.

Von den Kontrolltieren zeigte das mit steriler Bouillon geimpfte Kaninchen keinerlei Störungen des Allgemeinbefindens, während das mit aerob gezüchteter Bouillonkultur des Staphylokokkus aureus geimpfte Versuchstier innerhalb 24 Stunden verendete. Der Zerlegungsbefund zeigte Tracheitis und Pneumonie, sowie Leberdegeneration. Aus Milz, Leber, Lunge und Niere gelang der Nachweis des Staphylokokkus aureus.

Die **intravenöse Applikation** 24stündiger Bouillonkulturen führte in 3 Fällen zum Tode des Versuchstieres. Beachtlicherweise decken sich die klinischen und pathologisch-anatomischen Erscheinungen bei einem mit Kultur des Stammes Myom Uterus Mensch 55 und einem mit Stamm Sarkom Schädelbasis Mensch 63 vorbehandelten Kaninchen in sinnfälliger Weise. In beiden Fällen bestand zu Lebzeiten Lähmung der Nachhand, verbunden mit Muskelschwund, während die Zerlegung übereinstimmend Blasenlähmung sowie auffällige Blaßfärbung der Nieren ergab. Diese Beobachtungen können berechtigterweise als Folgeerscheinungen der stattgehabten intravenösen Applikation der Tumorkokkenkulturen aus Myom Uterus Mensch 55 und Sarkom Schädelbasis Mensch 63 angesehen werden. Recht beachtlich ist auch der Zerlegungsbefund des mit anaerob gezüchteter Kultur aus Myom Uterus Mensch 55 intravenös geimpften Kaninchens, der sich mit jenem des an einer Infektion mit Staphylokokkus aureus verendeten Kaninchens deckt. In beiden Fällen bestand übereinstimmend Tracheitis, Pneumonie und Leberdegeneration. Das konnte vor weiterem zu der Annahme berechtigen, daß sich das mit spezifischen Tumorkokken vorbehandelte Kaninchen durch Kontakt im gleichen Käfig mit dem an Staphylokokkus aureus erkrankten Kaninchen angesteckt hat. Dagegen aber spricht das eindeutige Ergebnis der kulturellen Untersuchung; denn es gelang bei dem mit Myom Uterus Mensch 55 geimpften Kaninchen diese Erreger in typischer Form und Wachstumseigenschaft wiederum zu isolieren und bei dem an Staphylokokken erkrankten Kaninchen nur den Staphy-

lokokkus aureus in goldgelben Kolonien auf den Nährmedien zu gewinnen. Diese Kulturbefunde gestatten im Zusammenhang mit den Sektionsergebnissen beider Kaninchen die Feststellung, daß Tracheitis, Pneumonie und Leberdegeneration, wie sie im Verlauf einer Infektion mit Staphylokokkus aureus aufzutreten pflegen, auch bei den mit Tumorkokken (Stamm Myom Uterus Mensch 55) geimpften Kaninchen gesehen werden können.

Schließlich wären noch die Ergebnisse der **intrakutanen** Verabreichung aerob und anaerob gezüchteter Bouillonkuren an Kaninchen und Meerschweinchen zu besprechen.

Die intrakutane Verabreichung aerob und anaerob gezüchteter Bouillonkulturen aus Papillom-, Sarkom-, Karzinom- und Myomstämmen führte bei Kaninchen und Meerschweinchen zu durchaus übereinstimmenden Ergebnissen. Während unmittelbar nach der Impfung und im Verlauf der nächsten 12 Stunden eine gut erbsengroße Papel die Impfstelle bezeichnete, zeigte sich nach 24 Stunden die Papel in allen Fällen eingetrocknet. Weitere 24 Stunden später (48 Stunden p. i.) trat bei Kaninchen und Meerschweinchen, die mit aerober oder anaerober Kultur vorbehandelt waren, mehr oder weniger stark ausgeprägte Rötung und Verdickung der Impfstelle auf. Dabei betrug die Rötungszone ungefähr die Größe eines Einpfennigstückes und war die Verdickung etwa in Erbsengröße feststellbar. 96 Stunden nach Versuchsbeginn war die Rötung bereits abgeklungen und auch die Verdickung erheblich zurückgegangen. Am 6. Tage der Beobachtung konnte diese in allen Fällen abgeschlossen werden, weil die Veränderungen entweder vollständig abgeklungen waren oder nur noch geringe Hautabschilferung sich an der Impfstelle vorfand. Lediglich in einem Falle bestand eitrige Einschmelzung an der Impfstelle, wohl als Folge einer Sekundärinfektion. In einem weiteren Fall trat wiederum beim Meerschweinchen eine multiple Abszeßbildung am Hals auf, die in Uebereinstimmung mit einem bereits beschriebenen Vorkommnis mit der spezifischen Impfung nicht in Einklang gebracht werden kann.

Während die subkutane und intrakutane Einverleibung 24stündiger aerob und anaerob gezüchteter Bouillonkulturen verschiedener Tumorkokkenstämme Kaninchen und Meerschweinchen in keiner Weise beeinflußte, gelang es beim Kaninchen bei intravenöser Verabreichung spezifische Folgeerscheinungen zu ermitteln, die in Lähmung der Nachhand in Verbindung mit Muskelschwund zu Lebzeiten und in Blasen- und Darmlähmung am zerlegten Tier bestanden. Dabei gelang in beiden Fällen bedauerlicherweise der kulturelle Nachweis der spezifischen Tumorkokken nicht. Trotzdem kann in keinem Fall dem Krankheitsbild am lebenden und toten Tier eine spezifische Bedeutung abgesprochen werden. Auch die bei anderen Kokkeninfektionen (durch Staphylokokkus aureus) beobachtete Tracheitis, Pneumonie und Leberdegeneration

wurde in Zusammenhalt mit der Verimpfung spezifischer Tumorkokken (aus Myom Uterus Mensch 55) in gleicher Weise festgestellt und auf Grund des bakteriologischen Ergebnisses mit der Tumorkokkeninfektion in ursächlichen Zusammenhang gebracht.

Zu ähnlichen Ergebnissen, wie sie durch die Verabreichung von Bouillonkulturen erzielt wurden, führte auch die subkutane, intravenöse und intraperitoneale Einverleibung von **keimfreien Kulturfiltraten** 7 verschiedener Stämme.

Während **subkutane** Applikation von Filtraten aerob gezüchteter Bouillonkulturen vom Meerschweinchen ohne irgendwelche Beeinflussung des Impftieres verliefen, verendeten von den subkutan geimpften Kaninchen das mit Kulturfiltrat aus Stamm Papillom Rind 40, Sarkom Schädelbasis Mensch 63 und Myom Uterus Mensch 55 vorbehandelte Impftier.

Das mit 6,15 ccm des nach **aerober** Züchtung hergestellten Bouillonkulturfiltrates aus Stamm Papillom Rind 40 geimpfte Kaninchen (im Gewicht von 1230 g) zeigte 20 Tage nach Versuchsbeginn starke Lähmung der Nachhand und verendete am 22. Tag. Am zerlegten Tier konnte Blasenlähmung, auffallende Blaßfärbung der Nieren, starke Blutfülle und Vergrößerung der Leber sowie geringe Mengen gelblicher klarer Flüssigkeit in der Bauchhöhle beobachtet werden. Wie zu erwarten stand, verlief eine bakteriologische Untersuchung der Organe negativ.

Bei dem mit 5,9 ccm eines auf gleiche Weise hergestellten Kulturfiltrates aus Stamm Sarkom Schädelbasis Mensch 63 subkutan geimpften Kaninchen (im Gewicht von 1180 g), das nach 15 Tagen verendete, konnte bei negativem bakteriologischen Untersuchungsergebnis der Organe lediglich eine äußerst starke Füllung der Blase festgestellt werden.

Von den mit Kulturfiltrat aus **anaerob** gezüchteten Stämmen geimpften Kaninchen verendete lediglich das mit 6,9 ccm Filtrat aus Stamm Myom Uterus Mensch 55 subkutan geimpfte (im Gewicht von 1380 g). Irgend welche sichtbaren Krankheitserscheinungen zu Lebzeiten bestanden nicht. Bei der Zerlegung wurden neben Blasenlähmung katarrhalische Darmentzündung sowie Tracheitis festgestellt. Auch in diesem Falle gelang es durch bakteriologische Untersuchung der Organe, die Anwesenheit irgendwelcher Krankheitserreger auszuschließen.

Das mit keimfreier Traubenzuckerbouillon subkutan geimpfte Kaninchen bzw. Meerschweinchen zeigte, wie auch die übrigen zum Versuch verwendeten Impftiere, keinerlei Krankheitserscheinungen.

Die **intraperitoneale** Einverleibung von Kulturfiltraten, die aus verschiedenen Tumorkokkenstämmen nach aerober und anaerober Züchtung in Traubenzuckerbouillon hergestellt waren, vermochte weder beim Kaninchen noch beim Meerschweinchen irgendwelche Störungen des Allgemeinbefindens auszulösen.

Auch die **intravenöse** Verabreichung gleicher Kulturfiltrate an Kaninchen zeitigte trotz der recht bedeutsamen Dosen von 8,5 bis 12,5 ccm bei einem Körpergewicht von 1700 bis 2500 g keinerlei Störungen.

Erwartungsgemäß wurde auch die bei diesen Versuchen zur Kontrolle verimpfte Traubenzuckerbouillon ohne jegliche Folgeerscheinungen vertragen.

Zusammenfassend kann gesagt werden: Während die intraperitoneale Verabreichung von Kulturfiltraten an Kaninchen und Meerschweinchen und die intravenöse Applikation an Kaninchen in großen Dosen keine sichtbaren Krankheitserscheinungen auszulösen vermochte, traten bei subkutan geimpften Kaninchen Todesfälle auf. Die bei den mit Kulturfiltrat aus Stamm Papillom Rind 40 (aerob) zu Lebzeiten beobachtete starke Lähmung der Nachhand, welche 20 Tage nach Versuchsbeginn erstmals in Erscheinung trat und 2 Tage später zum Tode führte, sowie die an diesem Impftier nach der Zerlegung festgestellte Blasenlähmung und Blaßfärbung der Nieren, wird in Uebereinstimmung mit früher gezogenen Schlußfolgerungen als spezifische Folgeerscheinung der Vorbehandlung angesehen. Auch die beiden übrigen Todesfälle am 15. Tag (Stamm Sarkom Schädelbasis Mensch 63 — aerob) und 19. Tag (Stamm Myom Uterus Mensch 55 — anaerob) möchten auf Grund des Zerlegungsbefundes und unter Ausschluß anderer bakterieller Erkrankungen in gleichem Sinne gewertet werden.

Die parenterale Einverleibung von Bouillonkulturen oder Kulturfiltraten führte nur beim Kaninchen und hier nur bei intravenöser bzw. subkutaner Verabreichung zu spezifischen Erkrankungen mit Todesfolge. Dabei zeitigten lediglich Bouillonkulturen und Kulturfiltrate aus einem Papillom-, einem Sarkom- und einem Myomstamm positive Ergebnisse. Bemerkenswert ist, daß insbesondere der Tumorkokkenstamm Myom Uterus Mensch 55 in aerob und anaerob gezüchteter Bouillonkultur nach 14 bzw. 5 Tagen bei intravenöser Verabreichung, und nach 19 Tagen bei subkutan verabreichtem Kulturfiltrat, welches aus anaerober Kultur hergestellt war, tötete. Der Tumorkokkenstamm Sarkom Schädelbasis Mensch 63 tötete bei intravenöser Verabreichung von Bouillonkultur (anaerob) am 10., bei subkutaner Einverleibung von Kulturfiltrat (aerob) am 15. Tag. Der zur Herstellung eines Kulturfiltrates verwendete Stamm Sarkom Pferd Hannover zeigte keinerlei pathogene Eigenschaften. Auch von den 2 Papillomstämmen (Papillom Rind 40 und Papillom Rind 67) vermochte nur einer (Papillom Rind 40) bei subkutaner Einverleibung eines aus aerob gezüchteter Kultur hergestellten Filtrates das Kaninchen am 20. Tag zu töten. Die beiden Karzinomstämme (Karzinom Magen Mensch 58 und Karzinom Uterus Mensch 55) wurden als Bouillonkultur und Kulturfiltrat in allen Fällen ohne jede sichtbare Wirkung vertragen.

Wenn den Tumorkokken verschiedener Herkunft auch nicht in allen Fällen eine unbedingte Pathogenität zugesprochen werden kann, so

steht doch fest, daß sie sowohl in Bouillonkulturen als auch in Kulturfiltraten bei Verabreichung hoher Dosen Krankheitserscheinungen auszulösen vermögen. Dabei erweist sich das Kaninchen bei intravenöser und subkutaner Einverleibung von Bouillonkulturen bzw. Kulturfiltrat anfälliger als das Meerschweinchen. Unwesentlich ist es, ob zur Anstellung der Pathogenitätsprüfung Bouillonkulturen oder keimfreie Filtrate älterer Bouillonkulturen, die aerob oder anaerob bebrütet wurden, benutzt werden. Von den klinischen und pathologisch-anatomischen Veränderungen wird die wiederholt beobachtete Lähmung der Nachhand sowie der Blase und des Darmes als eine für die Tumorkokken spezifische Krankheitserscheinung bezeichnet.

f) Allergische Reaktionen.

Wie die Pathogenitätsprüfung, so ergibt auch die Anstellung allergischer Reaktionen Einblick in die wechselseitigen Beziehungen zwischen Kleinlebewesen und Organismus und kennzeichnet dadurch den Erreger in mancherlei Hinsicht.

Bei der hohen Affinität vieler Kokkenarten gegenüber Haut und Schleimhaut und der immunbiologischen Bedeutung dieser Gewebe versprechen die Kutan-, Intrakutan- und auch die Ophthalmoreaktion ihre Brauchbarkeit als diagnostische Hilfsmittel.

Die allergischen Reaktionen wurden an Kaninchen vorgenommen, weil gerade von dieser Tierart bekannt ist, daß sie gegenüber Kokken äußerst empfänglich sind. 8 Kaninchen wurden während einer Dauer von 8 Wochen in dreitägigem Abstand mit je 1 ccm einer 24stündigen Bouillonkultur der Tumorkokken subkutan geimpft und zwar je 2 mit einer Papillom-, bzw. Karzinom-, Sarkom- und Myomkultur.

Zur Herstellung der Allergene wurden dreiwöchige Bouillonkulturen 4 verschiedener Kokkenstämme (Papillom Rind 67, Sarkom Schädelbasis Mensch 63, Karzinom Magen Mensch 58 und Myom Uterus Mensch 55), welche aerob bzw. anaerob bebrütet waren, verwendet. Zur Erhöhung der Haltbarkeit der aus den Bouillonkulturen hergestellten Eindickungen wurde der sonst verwendeten Traubenzuckerbouillon (pH 7,8) 1 % Glyzerin zugesetzt. Die kräftig gewachsenen Kulturen wurden vor ihrer Verwendung durch Erhitzen in Porzellanschälchen auf $^1/_{10}$ ihres Volumens eingedickt. Die so hergestellten Allergene erwiesen sich als gut haltbar.

Von den allergischen Reaktionen sollte die Kutan-, Intrakutan- und die Ophthalmoreaktion angestellt werden.

Die **Kutanreaktion** wurde nach Entfernung der Haare in Talergröße (mit einem Enthaarungsmittel) auf der seitlichen Brustwand vorgenommen. Die Haut wurde hier mit mehreren kreuzweise geführten Schnitten leicht skarifiziert, wobei eine Blutung unter allen Umständen vermieden wurde. Das Allergen wurde mit einem Pinsel eingestrichen.

Ein mit Papillomkultur vorbehandeltes Kaninchen wurde an 2 nebeneinander liegenden Stellen mit aerob bzw. anaerob hergestellter und eingedickter Papillomkultur und an einer dritten, benachbarten Stelle, mit Traubenzuckerglyzerinbouillon eingerieben. In gleicher Weise wurde mit einem mit Karzinom-, bzw. Sarkom-, bzw. Myomkultur vorbehandelten Kaninchen verfahren. Es wurden in diesen Versuchen also stets die der Infektion homologen Allergene angewandt.

Zur Anstellung der **Intrakutanreaktion** wurden wiederum an einer gut talergroßen Stelle an der Brustseite der Kaninchen die Haare entfernt. Mit Hilfe einer Spritze mit kurzer, wiederstandsfähiger Injektionsnadel, wurde an 3 nebeneinander liegenden Stellen aerob und anaerob hergestellte Bouillonkultureindickung und zur Kontrolle wiederum Nährmedium allein intrakutan eingespritzt. Im allgemeinen gelang es, eine Menge von 0,2 ccm einzuverleiben, wobei sich eine ca. erbsengroße, deutlich sichtbare und meist von der Umgebung stark abgegrenzte Impfpapel bildete. Wie bei der Kutanreaktion wurden auch hier den vorbehandelten Kaninchen nur homologe Antigene verabreicht (dem mit Papillomkultur vorbehandelten eingedickte Papillomkultur u. s. w.).

Bei der **Ophthalmoreaktion** wurde mit Hilfe eines feinen Haarpinsels ein kräftiger Tropfen in den unteren Lidsack gebracht und nach Schließen des Auges zwischen Daumen und Zeigefinger der Pinsel aus dem medialen Augenwinkel entfernt. Auch hier wurde, wie bei den übrigen Versuchen, die homologe Kultureindickung verwendet. Zur Kontrolle wurde bei diesem Versuch ein nicht vorbehandeltes Kaninchen beigezogen.

In einem späteren Kreuzversuch wurde die Brauchbarkeit **heterologer** Allergene zum Nachweis einer stattgehabten Infektion geprüft. Diese Untersuchungen wurden in der Weise angestellt, daß an den während mehrer Wochen mit Bouillonkulturen vorbehandelten Kaninchen die Intrakutanreaktion mit den bisher benützten Kultureindickungen des Papillom-, Karzinom-, Sarkom- und Myomstammes vorgenommen wurde. Es erhielt das mit Papillomkultur vorbehandelte Kaninchen eine aerob hergestellte Bouillonkultureindickung des Karzinomstammes, das mit Sarkomkultur vorbehandelte Impftier Papillomkultur (aerob), das mit Karzinomkultur vorbehandelte Myomkultur (aerob) und schließlich das mit Myomkultur vorbehandelte Kaninchen ein Allergen aus Sarkomkokken (aerob). Der Versuch sollte erweisen, inwieweit die Tumorkokkenstämme verschiedener Herkunft verwandtschaftliche Beziehungen bei der Intrakutanreaktion aufzuzeigen vermochten.

Versuchsergebnisse:

Die **Kutanreaktion** unter Verwendung **aerob** hergestellter Kultureindickungen eines Papillom-, Karzinom-, Sarkom- und Myomstammes zeigte erstmals 4 Stunden nach Versuchsbeginn bei allen Versuchstieren

übereinstimmend leichte Schwellung und mehr oder weniger deutlich in Erscheinung tretende Rötung der Impfstelle in ca. Pfennigstückgröße. Diese Reaktionserscheinungen konnten in gleicher Ausbildung auch nach 9, 20 und 44 Stunden gesehen werden. Nach 68 Stunden war die Rötung in allen Fällen verschwunden und leichte Schorfbildung an der skarifizierten Stelle eingetreten.

Bei Verwendung **anaerob** hergestellter Kultureindickungen derselben Stämme kam es nur zu unwesentlichen Abweichungen insofern, als Rötung und Schwellung nach 4 Stunden nur in einem Fall (Kultureindickung aus Stamm Sarkom Schädelbasis Mensch 63) auftrat, während es in allen übrigen Fällen erst nach 9 bzw. 20 Stunden zu leichter Schwellung mit oder ohne Rötung kam. Auch hier war die Reaktion nach 68 Stunden abgeklungen und nur mehr leichte Schorfbildung an der Impfstelle zu beobachten.

4 Kontrollversuche, in welchen Traubenzuckerglyzerinbouillon zur Kutanreaktion verwendet wurde, verliefen in 3 Fällen negativ; lediglich in einem Fall (bei dem mit Kokken des Stammes Karzinom Magen Mensch 58 vorbehandelten Kaninchen) trat in der 44. Stunde leichte Schwellung auf, welche nach weiteren 24 Stunden wieder abgeklungen war.

Die **Kutanreaktion** unter Verwendung aerob gezüchteter und eingedickter Bouillonkulturen eines Papillom-, Karzinom-, Sarkom- und Myomstammes führt bei mit homologen Kokkenstämmen vorbehandelten Kaninchen zu positiven Ergebnissen, die frühestens nach 4 Stunden als leichte Rötung und Schwellung der Impfstelle beobachtet werden können und bis zur Dauer von 4 Stunden fortbestehen. 64 Stunden nach Reaktionsbeginn klingt die Reaktion ab. Irgendwelche Schädigungen an der Impfstelle treten in keinem Fall in Erscheinung. Die aus anaerob gezüchteten Bouillonkulturen hergestellten Allergene sind den aerob hergestellten kaum unterlegen. Die Reaktion setzt unter Verwendung anaerob hergestellter Kultureindickungen 5 Stunden später und in geringerem Maße ein. Der negative Ausfall der Kontrollversuche spricht für die Brauchbarkeit der Kutanreaktion.

Die **Intrakutanreaktion** führte bei Verwendung aerob und anaerob hergestellter Kultureindickungen der 4 verschiedenen Tumorkokkenstämme zu übereinstimmend positiven Ergebnissen. Frühestens 6 Stunden nach Versuchsbeginn zeigte sich an der Impfstelle um die Impfpapel eine deutliche, scharf abgegrenzte Rötung, wie sie als Kokardenbildung bezeichnet wird. Bis zur 48. Stunde breitete sich der Entzündungshof um die Impfpapel bis zu Markstückgröße aus, die Kokardenbildung wurde noch deutlicher, weil nunmehr die Impfpapel in Form einer erhabenen gelben Blase erschien. 72 Stunden nach Versuchsbeginn verschwand die entzündliche Rötung, die Impfstelle war nur mehr von einem braunen Schorf bedeckt, der innerhalb der nächsten Tage, ohne das Impftier zu schädigen, abfiel.

Es ist unwesentlich, daß ein Versuchstier (das mit Kultur des Stammes Papillom Rind 67 vorbehandelt war) eine weniger deutliche Impfreaktion zeigte. Dieses Impftier hatte wegen großer Unruhe eine zu geringe Menge der homologen Kultureindickung erhalten.

4 Kontrollversuche unter Verwendung steriler Traubenzuckerglyzerinbouillon führten zu keinerlei Veränderungen an der Impfstelle Insbesondere bestand in keinem Fall irgendwelche entzündliche Rötung

Zu gleich befriedigenden Ergebnissen führte auch die **Ophthalmoreaktion.** Alle 4 mit Papillom-, Karzinom-, Sarkom- und Myomkokken vorbehandelten Kaninchen zeigten frühestens 6 Stunden nach Verabreichung des homologen Allergens leichte Conjunktivitis mit reiskorngroßer Eiterpfropfbildung im medialen Augenwinkel. Die Reaktion bestand, sofern das Abputzen des Eiterpfropfens durch das Impftier verhindert werden konnte, bis zur 10. Stunde deutlich sichtbar fort. In einem Fall, bei dem mit Kokken des Stammes Sarkom Schädelbasis Mensch 63 vorbehandelten Kaninchen, wurde nach dieser Zeit ein erbsengroßer Eiterpfropf festgestellt. 24 Stunden nach Versuchsbeginn war in allen Fällen der eitrige Ausfluß abgeklungen, es bestand lediglich noch leichte Conjunktivitis, die nach weiteren 24 Stunden verschwand.

Irgendwelche Unterschiede in Bezug auf Eintritt und Stärke der Reaktion konnten bei Verwendung aerob oder anaerob gezüchteter und eingedickter Bouillonkulturen nicht gesehen werden.

Ein zum Vergleich mit eingedickter Papillomkultur an einem nicht vorbehandelten Kaninchen vorgenommener Versuch führte weder zu entzündlicher Rötung, geschweige denn zu Eiterbildung am behandelten Auge.

Die Brauchbarkeit der Kutan-, Intrakutan- und Ophthalmoreaktion unter Verwendung homologer Allergene zum Nachweis einer stattgehabten Infektion am Kaninchen gab Veranlassung, wenn auch in abgekürzter Form, Kreuzversuche in der Weise vorzunehmen, daß nunmehr heterologe Allergene zur Anstellung der **Intrakutanreaktion** verwendet wurden.

Auch diese Versuche führten zu brauchbaren Ergebnissen: Ohne Rücksicht auf das verwendete heterologe Allergen zeigten die 4 zum Versuch beigezogenen vorbehandelten Kaninchen nach 9 Stunden leichte bis starke Rötung der Impfstelle und mehr oder weniger starke Verdickung derselben. 24 Stunden nach Versuchsbeginn wurde die Reaktion noch deutlicher, es bestand bereits mehr oder weniger ausgeprägte Kokardenbildung. Nach weiteren 24 Stunden war die Rötung abgeklungen, die noch teilweise vorhandene Hautverdickung ging bis zur 96. Stunde zurück. Insonderheit wird hervorgehoben, daß besonders das mit Myom- und das mit Sarkomkokken vorbehandelte Kaninchen, welches mit Allergen aus Karzinom- bzw. Myomkokken intrakutan geimpft war, nach 24 Stunden eine Kokardenreaktion zeigte, wie

man sie in typischen Fällen der Intrakutanreaktion mit Tuberkulin am Meerschweinchen sehen kann.

Dieser Kreuzversuch zeigt, ebenso wie die vorhergehenden Versuche, daß die Intrakutanreaktion zum Nachweis einer stattgehabten Infektion mit Tumorkokken sichere Ergebnisse zu liefern vermag; er spricht auch für nahe verwandschaftliche Beziehungen zwischen den Tumorkokken verschiedenster Herkunft.

Zusammenfassend kann gesagt werden: **Allergische Reaktionen in Form der Kutan-, Intrakutan- und Ophthalmoreaktion sind zum Nachweis einer stattgehabten Infektion mit Tumorkokken beim Kaninchen wohl geeignet.** Allergene aus Papillom-, Karzinom-, Sarkom- und Myomkokken vermögen bei homologer und heterologer Anwendung eindeutige Reaktionen zu liefern. Heterologe Allergene zeigen bei Anwendung der Intrakutanreaktion eine stattgehabte Infektion mit Tumorkokken sicher an. Voraussetzung für alle diese positiven Ergebnisse ist allerdings eine genügend wirkungsvolle Vorbehandlung der Versuchstiere durch häufig wiederholte subkutane Einverleibung der spezifischen Erreger, wie sie in vorliegenden Versuchen statt hatte.

g) Serologische Untersuchungen.

Die Kennzeichnung der Tumorkokken aus verschiedenen Tumoren vervollständigen schließlich die serologischen Untersuchungen, wie sie einmal zum Nachweis stattgehabter Infektionen und weiterhin in umgekehrter Anwendung zur Identifizierung unbekannter Erreger mit Hilfe bekannter Antikörper durchgeführt wird. Von den verschiedenen serologischen Untersuchungsverfahren wurde hier die Agglutination, die Praezipitation und die Komplementbindungsreaktion versucht. Das hierzu benötigte Untersuchungsserum lieferten 4 bereits in früheren Versuchen (zur Anstellung der allergischen Reaktionen) verwendete Kaninchen, welche während 8 Wochen in 3tägigem Abstand mit Bouillonkultur eines Papillom-, Karzinom-, Sarkom- und Myomstammes subkutan vorbehandelt waren. Nach dieser Vorbehandlung wurden die Impftiere unter Wahrung der Sterilität entblutet, das Blut zentrifugiert und das Serum in Glasampullen eingeschmolzen und bis zur weiteren Verwendung im Kühlschrank aufbewahrt.

Versuchsergebnisse:

a) Die Agglutination.

Als agglutinierende Seren dienten von den oben erwähnten die Seren der mit Papillom-, Karzinom- und Myomkokken vorbehandelten Kaninchen. Als Testflüssigkeit wurden Abschwemmungen einer 24stündigen Kultur eines Papillom-, Karzinom- und Myomkokkenstammes auf Traubenzuckeragar mit Karbolkochsalzlösung (0,85 % NaCl; 0,5 % Karbol) verwandt.

In wiederholten Versuchen, unter Aenderung des Nährmediums, gelang es nicht, die bei Abschwemmung von Sarkomkokken (des Stammes Sarkom Schädelbasis Mensch 63) auftretende Autoagglutination zu vermeiden, auch wenn zur Abschwemmung an Stelle der Karbolkochsalzlösung physiologische Kochsalzlösung verwendet wurde. Auch die Verwendung von Bouillonkulturen eignete sich nicht, da der Sarkomstamm auch in diesem Nährmedium die gleiche Erscheinung zeigte und damit für die Verwendung zur Agglutination ungeeignet war.

Die Dichte der Testflüssigkeit wurde nach den bei anderen Agglutinationen verwendeten Testflüssigkeiten bemessen (Bangtest) und entsprach der Trübung, die bei Zusatz von 3 Teilen einer 1 % Bariumchloridlösung zu 97 Teilen einer 1 % Schwefelsäure entsteht.

Zur Kontrolle wurde Normalserum gesunder, nicht vorbehandelter Kaninchen verwendet.

Zur Einsparung des agglutinierenden Serums wurden zuerst Probeagglutinationen in den Verdünnungen 1 : 5, 10, 20 und 1 : 40 mit den 3 verschiedenen Untersuchungsseren und den dazu gehörigen homologen Testflüssigkeiten angestellt. Während die Seren der Kaninchen, die mit Papillomkokken und Myomkokken vorbehandelt waren, mit den entsprechenden Testflüssigkeiten aus Papillom- bzw. Myomkokken in den Verdünnungen 1 : 5 bis 1 : 40 übereinstimmend deutlich positive Reaktionen lieferten, vermochte das nach Vorbehandlung mit Karzinomkokken gewonnene Serum den homologen Stamm in keiner der angegebenen Verdünnungen zu agglutinieren.

Zur Ermittlung des Endtiters wurde das mit Papillomkokken sowie das mit Myomkokken agglutinierende Kaninchenserum in den Verdünnungen 1 : 5, 10, 20, 40, 80, 100, 200 und 1 : 400 mit den entsprechenden Testflüssigkeiten zur Agglutination angesetzt. Der Versuch ergab, daß das mit Papillomkokken agglutinierende Serum einen Endtiter von 1 : 200, das mit Myomkokken agglutinierende hingegen nur einen Endtiter von 1 : 40 gegenüber der homologen Testflüssigkeit aufwies.

In einem Kreuzversuch wurde nun die Agglutination der erwähnten Seren mit den **heterologen** Testflüssigkeiten geprüft. Es wurden Serumverdünnungen von 1 : 5 bis 1 : 200 beigezogen. Vergleichsweise wurde zu diesem Versuch auch die aus Karzinomkultur hergestellte Testflüssigkeit und zur Kontrolle Normalserum eines gesunden Kaninchens in gleichen Verdünnungen verwendet. Der Versuch ergab die in Tabelle 2 (Agglutination : Kreuzversuch) aufgeführten Ergebnisse.

Tabelle 2.
Agglutination : Kreuzversuch.

		Testflüssigkeit aus Kokkenstamm: Papillom Rind 67	Karzinom Magen Mensch 58	Myom Uterus Mensch 55
ggl. Kaninchen-seren für Kokken aus	Papillom Rind 67	Endtiter 1:200	Titer kleiner 1:5	Endtiter 1:200
	Myom Uterus Mensch 55	Endtiter 1:40	Titer kleiner 1:5	Endtiter 1:40
	Normalserum	Titer kleiner 1:5	Titer kleiner 1:5	Titer kleiner 1:5

Das mit Papillomkokken mit einem Endtiter von 1 : 200 agglutinierende Kaninchenserum agglutinierte in gleicher Titerhöhe auch die Myomkokken, das mit Myomkokken bis zu einem Endtiter von 1 : 40 agglutinierende Serum vermochte auch die Papillomkokken bis zu dieser Titerhöhe zusammenzuballen. Keines dieser beiden agglutinierenden Seren führte zu einer Agglutination der Karzinomkokkentestflüssigkeit. Auch das Normalserum lieferte in diesen Verdünnungen mit Papillom-, Karzinom- und Myomtestflüssigkeit ein negatives Ergebnis.

Diese wenigen Ergebnisse bei Verwendung zweier agglutinierender Kaninchenseren für Papillom- und Myomkokken führten zu recht beachtlichen Feststellungen: Durch wiederholte subkutane Einverleibung von Papillom- und Myomkokken gelingt es beim Kaninchen, spezifische Agglutinine zu erzeugen. Die dabei erzielten Endtiter von 1 : 200 bzw. 1 : 40 sind zwar an sich nur nieder, im Hinblick auf die allen Kokken eigene geringe Fähigkeit, Antikörper zu erzeugen, aber doch recht beachtlich. Bei der aus früheren Versuchen bereits ermittelten Identität von Kokkenstämmen verschiedener Herkunft wundert es nicht, daß auch in serologischer Beziehung, wie die vorliegenden Agglutinationsversuche eindeutig dartun, weitgehende Uebereinstimmung besteht. Recht auffällig ist allerdings das Versagen des Karzinomstammes, welcher weder mit dem homologen Serum noch mit den heterologen Seren (nach Vorbehandlung mit Papillom- und Myomkokken gewonnen) irgendwelche Verwandschaftsreaktionen zeigte. Eine Erklärung dieser Abweichung wird nach Darlegung der übrigen serologischen Untersuchungsergebnisse nachgeholt.

b) Die Präzipitation.

Zur Anstellung der Präzipitation wurden die präzipitierenden Seren von Kaninchen, welche, wie früher angegeben, während längerer Zeit

mit Kokkenkulturen aus Papillom Rind 67, Karzinom Magen Mensch 58, Sarkom Schädelbasis Mensch 63 und Myom Uterus Mensch 55 vorbehandelt waren, und Normalseren von Kaninchen, vom Pferd, vom Meerschweinchen und vom Menschen verwendet. Als Präzipitinogen wurde Schüttelextrakt und Kochextrakt aus denselben Kokkenstämmen, wie sie zur Immunisierung der Kaninchen verwendet wurden, beigezogen.

Zur Herstellung der Extrakte wurden 48stündige Kokkenkulturen auf Traubenzuckeragar in Kolleschalen als Ausgangsmaterial benützt.

Der **Schüttelextrakt** wurde daraus in der Weise angefertigt, daß die in allen Kolleschalen kräftig gewachsenen Kulturen mit 10 ccm physiologischer Kochsalzlösung pro Kultur abgeschwemmt und in gut verschließbaren Glasflaschen während 3 Tagen im Schüttelapparat mit Glasperlen geschüttelt wurden. Nach oberflächlichem Filtrieren der Bakterienaufschwemmung durch Hartpapierfilter wurde die keimfreie Filtration unter Benutzung des Seitzfilters angeschlossen. Das Filtrat wurde unter sterilen Verhältnissen in Glasampullen verbracht und eingeschmolzen. Es zeigt bei Aufbewahrung im Kühlschrank (bei 4—6° C) bis zur Anstellung des Versuches keinerlei Trübung oder Ausfällung.

Der **Kochextrakt** wurde aus gleicher Kulturabschwemmung, wie sie zur Herstellung des Schüttelextraktes Anwendung fand, gewonnen. Eine Erhitzung der Kokkenaufschwemmung während einer halben Stunde in kochendem Wasser wurde für ausreichend erachtet. Nach dem Erkalten erfolgte die weitere Verarbeitung durch Filtration usw. wie beim Schüttelextrakt. Auch der Kochextrakt zeigte bei längerer Aufbewahrung keinerlei Trübung oder Ausfällung.

In den ersten Versuchen wurden Kochextrakte bzw. Schüttelextrakte der verschiedenen Kokkenstämme unverdünnt in Mengen von 0,2 ccm über 0,3 ccm eines präzipitierenden Serums und verschiedener Normalseren in schlanken Glasröhrchen, wie sie auch zur Präzipitation bei Milzbrand angewendet werden, geschichtet.

Die Beobachtung wurde bis zu einer Dauer von 10 Minuten nach erfolgter Ueberschichtung unter Zuhilfenahme eines dunklen Hintergrundes, welcher die Feststellung eines Präzipitates erleichterte, vorgenommen.

Kochextrakte und Schüttelextrakte aus den Stämmen Papillom Rind 67, Karzinom Magen Mensch 58, Sarkom Schädelbasis Mensch 63 und Myom Uterus Mensch 55 lieferten mit den homologen Seren übereinstimmend deutlich sichtbare Präzipitationen, welche nach ca. 5 Minuten auftraten. Der Kochextrakt aus Papillomkokken erbrachte mit dem homologen Kaninchenserum (Papillom Rind 67) eine etwas schwächere Reaktion, während alle übrigen als auffallend stark angesprochen werden konnten.

Mit den verwendeten Normalseren konnte auch nach Beendigung der Beobachtungszeit (10 Minuten) irgendwelche Trübung an der Berührungsfläche nicht festgestellt werden.

Wie bei den Agglutinationsversuchen so erschien es auch hier angezeigt, in Kreuzversuchen die Reaktion der Extrakte mit den **heterologen** präzipitierenden Seren zu prüfen. Unverdünnte Koch- bzw. Schüttelextrakte der verschiedenen Tumorkokkenstämme wurden in gegenseitigem Wechsel unter Beibehaltung der bereits angegebenen Versuchstechnik über die verschiedenen präzipitierenden Seren geschichtet.

Den Kreuzversuchen wurden zum Ausschluß unspezifischer Präzipitationen, wie sie immer wieder einmal vorkommen, Kontrollversuche unter Verwendung eines Normalkaninchenserums beigegeben.

Das Ergebnis dieser Versuche war wiederum recht eindeutig. Sämtliche Koch- und Schüttelextrakte der verschiedenen Kokkenstämme bewirkten in allen präzipitierenden Seren deutlich sichtbare Präzipitationen. Die homologen Präzipitationen lieferten im allgemeinen die stärksten Reaktionen. Alle heterologen Präzipitationen führten bei Verwendung von Schüttelextrakt zu fast gleich starken Reaktionen, bei Verwendung von Kochextrakt wurden zum Teil wohl schwächere Reaktionen beobachtet, die aber in jedem Fall als eindeutig positiv zu werten waren. Die Kontrollversuche waren in allen Fällen negativ.

Es ist eine bekannte Erscheinung, daß **verdünnte** Koch- und Schüttelextrakte, ebenso wie Lipoidextrakte, in der Präzipitation früher eintretende und zum Teil auch schärfere Reaktionen zu liefern vermögen als konzentrierte. Aus diesem Grunde wurden in weiteren Versuchen die Koch- und Schüttelextrakte der verschiedenen Tumorkokkenstämme in den Verdünnungen 1 : 20, 40, 60, 80 und 1 : 100 den homologen präzipitierenden Seren überschichtet. Dabei zeigte sich, daß die Koch- und Schüttelextrakte in den Verdünnungen von 1 : 20 bis 1 : 100 positive Ergebnisse lieferten, welche bei 1 : 40 wohl am deutlichsten, bei 1 : 100 dagegen am schwächsten ausfielen.

Schließlich wurden noch Koch- und Schüttelextrakte an verschiedenen Kokkenstämmen in den Verdünnungen 1 : 40 mit den homologen und heterologen präzipitierenden Seren in einem Kreuzversuch geprüft. Dieser zeigte gegenüber den früher beschriebenen Kreuzversuchen mit unverdünntem Extrakt keinerlei wesentliche Unterschiede. In allen Fällen wurden mehr oder weniger starke, aber stets deutlich sichtbare Reaktionen erzielt.

Die Präzipitation unter Verwendung von Koch- und Schüttelextrakten von Tumorkokken aus Stamm Papillom Rind 67, Karzinom Magen Mensch 58, Sarkom Schädelbasis Mensch 63 und Myom Uterus Mensch 55 liefert bei Anwendung der Schichtprobe mit präzipitierenden Seren eindeutig positive Ergebnisse.

c) Die Komplementbindungsreaktion.

Die guten Ergebnisse bei Anstellung der Agglutination und Präzipitation gaben Veranlassung, auch die Komplementbindungsreaktion mit Tumorkokkenextrakten heranzuziehen.

Als **Untersuchungsseren** wurden die allen serologischen Untersuchungen zu Grunde gelegten Seren von Kaninchen, die während mehrerer Wochen wiederholt mit Kokken aus Papillom Rind 67, Karzinom Magen Mensch 58, Sarkom Schädelbasis Mensch 63 und Myom Uterus Mensch 55 vorbehandelt waren, verwendet. Zum Vergleich wurden Normalseren von gesunden Kaninchen beigezogen.

Als **Extrakte** wurden 48stündige Tumorkokkenkulturen aus den oben angeführten Stämmen auf Traubenzuckeragar benutzt. Die kräftig gewachsenen Kulturen wurden mit ca. 10 ccm physiologischer Kochsalzlösung je Kolleschale abgeschwemmt und diese Abschwemmungen während 3 Tagen abwechslungsweise im Brutraum (37° C) bezw. Kühlschrank (4—6° C) aufbewahrt. Nach dieser Zeit wurden die Kokkenaufschwemmungen 3 Tage lang im Schüttelapparat mit Glasperlen geschüttelt. Nachdem sich durch 20 Minuten langes Zentrifugieren bei 3000 Umdrehungen je Minute die überstehende Flüssigkeit wasserklar vom Bodensatz abschied, erübrigte es sich, die Extrakte noch zu filtrieren.

Als **Komplement** diente frisch hergestelltes Meerschweinchenserum. Die Komplementauswertung ergab, daß es in der Menge von 1,2 % zur Anstellung der Komplementbindung geeignet war.

Der **Ambozeptor** war der an der Anstalt gebräuchliche haemolytische Ambozeptor, welcher bei einem Endtiter von 1 : 4000 (gegenüber 4 % Hammelblutkörperchen) in der Verdünnung 1 : 100 für den Versuch benutzt wurde.

Die Hammelblutkörperchen wurden in 2prozentiger Lösung in Kochsalzbrunnenwasser angewandt.

Die aus den Kokken der Stämme Papillom Rind 67, Karzinom Magen Mensch 58, Sarkom Schädelbasis Mensch 63 und Myom Uterus Mensch 55 hergestellten Extrakte wurden konzentriert und in Verdünnungen von 1 : 2, 4, 6, und 1 : 8 mit dem homologen Untersuchungsserum, das in den Mengen von 0,2, 0,1, 0,05, 0,02 und 0,01 ccm zur Anwendung kam, geprüft. Diesen Flächenversuchen wurde in gleicher Anordnung ein weiterer unter Verwendung von Normalkaninchenserum angegliedert. Diese Versuche sollten die Arbeitsbreite der Extrakte und Seren erweisen und damit der Auswertung beider dienen. Es wurde nicht unterlassen, die in allen Fällen notwendigen Kontrolluntersuchungen (Prüfung des hämolytischen Systems, des Komplements, des Ambozeptors sowie der Kochsalzlösung) beizuziehen.

Die Extraktauswertung ergab, daß der aus Papillom-, Sarkom- und Myomkokken hergestellte Extrakt in der Verdünnung 1 : 4 mit dem homologen Serum in Mengen von 0,2, 0,1 und 0,05 positive Ergebnisse

lieferte und daß diese Verdünnung für spätere Versuche sich als brauchbar erwies, weil sie bei Verwendung von Normalserum in keinem Fall zu positiven Ergebnissen führte. Der aus Karzinomkokken hergestellte Extrakt arbeitete in einer Verdünnung 1 : 2 insofern besser als hier die Serumwerte von 0,2, 0,1 und 0,05 noch vollkommene Hemmung bedingten, während er in der Verdünnung 1 : 4 nur bei den Serummengen 0,2 und 0,1 ein noch positives Ergebnis zeitigte. Dieses Ergebnis der Auswertung gab Veranlassung, den aus Karzinomkokken hergestellten Extrakt in der Verdünnung 1 : 2 anzuwenden.

In 4 Flächenversuchen wurde Serum von Kaninchen, die mit Kokken vom Stamm Papillom Rind 67, Karzinom Magen Mensch 58, Sarkom Schädelbasis Mensch 63 und Myom Uterus Mensch 55 vorbehandelt waren, in Mengen von 0,2, 0,1 sowie 0,05 mit den Extrakten aus Kokkenkulturen derselben Stämme in der Verdünnung 1 : 4 bzw. 1 : 2 (Karzinom Magen Mensch 58) angesetzt. Auf diese Weise kamen nicht nur die homologen, sondern auch die heterologen Extrakte bzw. Seren zur Prüfung.

Zur Kontrolle wurde ein weiterer Flächenversuch unter Verwendung der gleichen Extrakte und Extraktverdünnungen und von Normalkaninchenserum in den Mengen von 0,2, 0,1 und 0,05 angesetzt.

Der Extrakt aus Papillom- und Myomkokken bedingte in den **homologen** Seren totale Hemmung bei den Serumwerten von 0,2 und 0,1, der Extrakt aus Karzinom- und Sarkomkokken lediglich bei der größeren Serummenge von 0,2. Mit den **heterologen** Seren lieferten sämtliche Extrakte in der Menge von 0,2 mehr oder weniger starke, jedoch deutlich feststellbare Hemmung, mit der Serummenge 0,1 nur recht geringe, teilweise unvollständige Hemmung, vereinzelt einmal Hämolyse. Die kleinste Serummenge von 0,05 vermochte nur vereinzelt einmal geringe bzw. unvollständige Hemmung auszulösen.

Die Kontrollen mit Normalserum lieferten in allen Fällen ein negatives Ergebnis.

Auch die Komplementbindungsreaktion ermöglicht, ebenso wie die Agglutination und Präzipitation, den Nachweis einer stattgehabten Infektion und bestätigt die nahen serologisch verwandtschaftlichen Beziehungen der Tumorkokkenstämme aus verschiedenartigen Geschwülsten. Wie bei den übrigen serologischen Untersuchungen, so gilt diese Feststellung auch hier wiederum nur mit der Einschränkung, daß nach den vorliegenden Versuchen ihre Brauchbarkeit nur für solche Seren erwiesen ist, die von wiederholt und während längerer Zeit vorbehandelten Versuchstieren stammen.

An dieser Stelle darf nicht unerwähnt bleiben, daß die sonst lückenlosen Ergebnisse der serologischen Untersuchungen durch die mangelnde Agglutinabilität eines Karzinomstammes (aus Karzinom Magen Mensch 58) gestört wurden. Nachdem sowohl die Präzipitationsver-

suche wie auch die Komplementbindungsversuche, welche unter Verwendung dieses Kokkenstammes mit homologen und heterologen Seren angestellt wurden, stets ein positives Ergebnis zeitigten, vermag der Ausfall der Agglutination in beiden Seren nur damit begründet zu werden, daß dieser Kokkenstamm, wie das auch bei anderen Bakterienstämmen nicht gerade selten ist, als inagglutinabel gelten muß. Inwieweit die fehlende Agglutinabilität durch Tierpassage oder Kulturversuche zu beheben gewesen wäre, konnte später nicht mehr geprüft werden. Die Beobachtung zeigt indessen, was für Kokkenstämme im allgemeinen nicht verwunderlich ist, daß auch in dieser Gruppe von Kleinlebewesen Störungen im serologischen Verhalten auftreten können. Ein Anlaß, diesem Kokkenstamm auf Grund der mangelnden Agglutinabilität die Zugehörigkeit zu den Tumorkokken abzusprechen, besteht weder auf Grund der übrigen serologischen noch der sonstigen Prüfungen, welche an diesem Stamm vorgenommen worden sind.

Zusammenfassung.

Aus 26 verschiedenen, gutartigen und bösartigen Geschwülsten von Mensch und Tier gelang der Nachweis eines Kokkus. Seine eingehende Beschreibung erfolgte nicht, weil ihm eine ursächliche Beziehung zum Krebs zugesprochen, sondern weil eine Lücke im Schrifttum, das bislang eine genügende Kennzeichnung der bei allen bakteriologischen Untersuchungen an Tumoren anzutreffenden Kokken vermissen ließ, ausgefüllt werden sollte.

1. Die Züchtung des Erregers aus den Organen gelingt im allgemeinen nur schwer. Umfangreiche Untersuchungen haben dargetan, daß nach Einschaltung einer Anreicherung in Traubenzuckerbouillon (pH 7,8) die Züchtung auf Traubenzuckeragar zu lückenlosen Ergebnissen führt.

2. Die mikroskopische Untersuchung zum Nachweis der Erreger bestätigt, daß die Kokken in den Tumoren gewöhnlich nur in geringen Mengen vorhanden sind; der Nachweis gelingt selten.

3. Zur Färbung des Erregers eignen sich alle gebräuchlichen Anilinfarben. Die besten Ergebnisse liefert die Gramsche Färbung und die Färbung nach Giemsa. Als wenig geeignet erweisen sich die Färbemethoden nach Ziehl — Neelson und nach Gerlach. Zur Färbung der Erreger aus Organmaterial, flüssigen und festen Kulturen, wird die Gramsche Färbung empfohlen.

4. Kennzeichnend für den Erreger ist der Formenreichtum bei jungen und alten, bei flüssigen und festen Kulturen.

5. Die Mannigfaltigkeit der Form bedingt erhebliche Größenunterschiede; eine zahlenmäßige Größenangabe hat daher keine praktische Bedeutung.

6. Entgegen den Mitteilungen im Schrifttum kann weder in Organ- noch in Kulturausstrichen eine Kapselbildung beobachtet werden.

7. Bei fortlaufender Beobachtung des Erregers in flüssigen Nährmedien erweist sich dieser stets als unbeweglich.

8. Der Erreger gedeiht unter aeroben und anaeroben Verhältnissen gleich gut.

9. Von den flüssigen Nährmedien eignet sich Rindfleischtraubenzuckerbouillon mit einem pH-Gehalt von 7,8 am besten, von den festen Nährmedien besonders der Traubenzuckeragar. Ein Zusatz von sterilem

Rinder- oder Pferdeblut zu diesem Nährmedium fördert das Wachstum und ermöglicht die bei diesem Erreger stets mehr oder weniger auftretende Hämolyse festzustellen. Während der Zusatz von Traubenzucker für ein optimales Wachstum unerläßlich ist, können andere Zusätze, wie Aszites- oder Amnionsflüssigkeit, entbehrt werden.

10. In flüssigen Nährmedien gedeiht der Erreger unter zunehmender Trübung des Nährsubstrates bei besonders günstigen Wachstumsbedingungen unter starker Bildung eines flockig-krümeligen Bodensatzes. Auf festen Nährmedien entstehen milchigweiße bis grauweiße, scharf begrenzte, an der Oberfläche glasig glänzende Kolonien, die meist kreisrund oder oval sind und auf feuchteren Nährmedien leicht zusammenfließen. In Mikrokulturen auf dem Tragglas nach dem Verfahren von Fortner sind die Kolonien durchscheinend, scharf begrenzt und von runder oder auch unregelmäßig fleckenartiger Form.

11. In biochemischer Hinsicht zeigen die Erreger bei geringer Aktivität ein durchaus einheitliches Verhalten, das lediglich in Form geringer oder verzögerter Säurebildung in Milchzucker, Traubenzucker, Saccharose, Mannit und Lackmusmilch zum Ausdruck kommt. Sie bilden kein Indol und verflüssigen Gelatine nicht.

12. Bouillonkulturen und Filtrate aus solchen führen, ebenso wie auf 63° C erhitzte Kulturfiltrate, bei allen nach dem Verfahren von Bernard untersuchten Kokkenstämmen zu mehr oder weniger deutlicher Hämolyse.

13. Gegen Hitze und Kälte sind die Erreger äußerst widerstandsfähig. Sie überstehen eine vorübergehende kurzdauernde Erhitzung auf Siedetemperatur ebenso wie Gefriertemperaturen. An Filtrierpapierstreifen angetrocknete Erreger halten sich bei Unterbringung im Kühlschrank (4—6° C) über die Dauer von 9 Wochen hinaus lebensfähig, bei Haltung in Zimmertemperatur (18—20° C) und Tageslichteinwirkung bis zu 2 Wochen, bei Aufbewahrung im Brutschrank (37° C) bis zu 3 Wochen. Austrocknung und Einwirkung des Tageslichtes setzen ihre Lebens- und Vermehrungsfähigkeit stark zurück.

14. Die Pathogenität der Erreger gegenüber Kaninchen und Meerschweinchen ist gering. Während die subkutane und intrakutane Einverleibung 24stündiger aerob und anaerob gezüchteter Bouillonkulturen Kaninchen und Meerschweinchen in keiner Weise beeinflußt, gelingt es beim Kaninchen bei intravenöser Verabreichung spezifische Folgezustände zu ermitteln, die in Lähmung der Nachhand mit Muskelschwund zu Lebzeiten, und in Blasen- und Darmlähmung am zerlegten Tier bestehen. Auch die bei anderen Kokkeninfektionen zu beobachtende Tracheitis, Pneumonie und Leberdegeneration wird in Zusammenhalt mit der Verimpfung der spezifischen Kokken in gleicher Weise festgestellt. Während bei subkutaner Verimpfung von Kulturfiltraten beim Kaninchen Todesfälle unter den Erscheinungen einer Lähmung

der Nachhand sowie der Blase auftreten, können bei den intravenös und intraperitoneal vorbehandelten Impftieren keinerlei Krankheitserscheinungen beobachtet werden. Dabei soll nicht unerwähnt bleiben, daß nur verhältnismäßig hohe Dosen diese Schädigungen auslösen.

15. Allergische Reaktionen, wie die Kutan-, Intrakutan- und die Ophthalmoreaktion, führen bei Verwendung aerob oder anaerob hergestellter Kultureindickungen an Kaninchen, die während längerer Zeit und zu wiederholten Malen mit den Erregern vorbehandelt waren, zum Nachweis der stattgehabten Infektion. Dabei zeigt sich, daß homologe und heterologe Antigene von gleicher Wirksamkeit sind.

16. Serologische Untersuchungen mit Hilfe der Agglutination, Präzipitation und der Komplementbindung ermöglichen den Nachweis einer stattgehabten Infektion und sprechen für nahe serologisch verwandtschaftliche Beziehungen zwischen den Erregern verschiedenster Herkunft.

Die morphologischen, kulturellen, biochemischen und serologischen Untersuchungen, die Prüfung der Pathogenität und Resistenz, sowie die allergischen Untersuchungen an Kokkenstämmen aus den verschiedensten Geschwülsten zeigen ohne nennenswerte Abweichungen ein so einheitliches Verhalten, daß kein Zweifel darüber besteht, daß es sich um durchaus identische Erreger handelt. Wegen ihres konstanten Vorkommens in gutartigen und bösartigen Geschwülsten von Mensch und Tier wird die im Schrifttum eingeführte Benennung als „Tumorkokken“ für zutreffend erachtet. Die Mannigfaltigkeit der Form, welche in festen und flüssigen, jungen und alten Kulturen die Tumorkoken stets kennzeichnet, und die allen Stämmen, wenn auch in unterschiedlichem Maße, eigene Fähigkeit, Hämolyse zu erzeugen, berechtigt zu der Bezeichnung „Tumorkokkus polymorphus haemolytikus“.

Am Schlusse meiner Arbeit ist es mir eine angenehme Pflicht, Herrn Prof. Dr. Beck für die Ueberlassung des Themas, für die Bereitstellung des Materials sowie für die gütige Beratung während meiner Arbeit meinen wärmsten Dank auszusprechen.

Auch Herrn Veterinärmedizinalrat Dr. Hopfengärtner bin ich für die freundliche Anleitung und Beihilfe bei der Durchführung meiner Versuche zu großem Danke verpflichtet.

Literatur.

1. Aman: Zur Entstehung und Frühdiagnose des Krebses. Repetitorienverlag Leipzig 1934.

2. Aman: Neue Wege zur Erkennung und Behandlung des Krebses. Mai 1936.

3. Aman: Briefwechsel mit der Veterinärpolizeilichen Anstalt in Schleißheim, Mai 1936.

4. v. Brehmer: Untersuchungen über Siphonospora polymorpha. Die Medizinische Welt, 8. Jahrg. 1934, Nr. 34.

5. Fränkel: Zit. nach Blumenthal. Ergebnisse der experimentellen Krebsforschung und Krebstherapie. Leiden 1934.

6. Fujinami und Inamoto: Zit. nach Blumenthal. Ergebnisse der experimentellen Krebsforschung und Krebstherapie. Leiden 1934.

7. Gerlach: Ergebnisse mikrobiologischer Untersuchungen bei bösartigen Geschwülsten. Wiener klinische Wochenschrift 1937, Nr. 47.

8. Glover: Zit. nach Teutschlaender. Infektion und Krebs. Zeitschr. f. Krebsforschung. Bd. 24. Heft 3/4. Berlin 1927.

9. Joung und Edinburgh: Zit. n. Teutschlaender. Infektion und Krebs. Zeitschr. f. Krebsforschung. Bd. 24. Heft 3/4. Berlin 1927.

10. Kitt: Zit. nach Profe. Ueber das Vorkommen eines Mikrokokken in Tumoren. Mitteilungen aus Dr. Schmidts Laboratorium für Krebsforschung. Verlag Martin Hager, Bonn 1905.

11. Loudon und Mc. Cormack: Zit. nach Teutschlaender. Infektion und Krebs. Zeitschrift für Krebsforschung. Bd. 24. Heft 3/4. Berlin 1927.

12. Nuzum: Zit. nach Teutschlaender. Infektion und Krebs. Zeitschrift für Krebsforschung. Bd. 24. Heft 3/4. Berlin 1927.

13. Ochsner: Zit. nach Teutschlaender. Infektion und Krebs. Zeitschr. f. Krebsforschung. Bd. 24. Heft 3/4. Berlin 1927.

14. Profe: Ueber das Vorkommen eines Mikrokokken in Tumoren. Mitteilungen aus Dr. Schmidts Laboratorium für Krebsforschung. Verlag Martin Hager, Bonn 1905.

15. Rappin und d'Herelle: Zit. nach Blumenthal. Ergebnisse der experimentellen Krebsforschung und Krebstherapie. Leiden 1934.

16. Scott: Zit. nach Teutschlaender. Infektion und Krebs. Zeitschrift für Krebsforschung. Band 24. Heft 3/4. Berlin 1927.

17. Teutschlaender: Infektion und Krebs. Zeitschrift für Krebsforschung. Bd. 24. Heft 3/4. Berlin 1927.

Lebenslauf.

Geboren zu Benediktbeuern am 9. April 1913 als Sohn des kgl. bayer. Remonte-Depot-Inspektors Anton Forster und dessen Frau Maria, geb. Grundler, habe ich dortselbst 1½ Jahre und dann in Schleißheim 2½ Jahre die Volksschule besucht.

Vom April 1923 ab besuchte ich das Wittelsbacher Gymnasium in München, wo ich am 17. März 1932 absolvierte, um mich dann dem Studium des Forstwesens an der Universität in München zu widmen.

Nach Schluß des Wintersemesters 1932/33 wechselte ich mein Studienfach und studierte Tierheilkunde.

Auch weiterhin verbrachte ich meine ganze Studienzeit in München, wo ich am 29. November 1937 die tierärztliche Prüfung beendete.

Seit dem 1. Januar 1938 bin ich als Veterinärpraktikant am Schlacht- und Viehhof in München.

Vom 1. Juli 1936 ab war ich während der Semesterferien mit der Anfertigung vorliegender Arbeit an der Veterinärpolizeilichen Anstalt in Schleißheim beschäftigt.